



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월12일
 (11) 등록번호 10-1957384
 (24) 등록일자 2019년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7036895
- (22) 출원일자(국제) 2016년01월15일
 심사청구일자 2016년12월29일
- (85) 번역문제출일자 2016년12월29일
- (65) 공개번호 10-2017-0010865
- (43) 공개일자 2017년02월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/KR2016/000474
- (87) 국제공개번호 WO 2016/122147
 국제공개일자 2016년08월04일
- (30) 우선권주장
 PCT/KR2015/000854 2015년01월27일
 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 Arthritis Research & Therapy. 2007, 9:R125.*
 Beeton C., Chandy G.K.(2007) Enrichment of NK
 cells from Human Blood with the RosetteSep
 Kit from StemCell Technologies. JoVE. 8.*
 Cryotherapy. 2009, 11(4):472-479.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
최인표
 대전광역시 유성구 과학로 125
윤석란
 대전광역시 유성구 과학로 125
이수연
 대전광역시 유성구 과학로 125
- (74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 수득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도**

(57) 요약

본 발명은 자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 수득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하면 신선 NK 세포를 종래의 방법보다 빠른 시간 내에 고순도로 수득할 수 있으며, 또한 신선 NK 세포와 동등한 효능을 갖는 냉장보관 NK 세포, 냉동보관 NK 세포를 제조할 수 있다. 더 나아가 냉동보관된 CD3 음성세포로부터 신선 NK 세포와 동등한 효능을 갖는 NK 세포를 제조할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 신선 NK 세포, 냉장보관 NK 세포, 및 냉동보관 NK 세포는 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병을 포함하는 다양한 암에 대해 치료 효과를 나타내어 세포치료제로서 유용하게 사용될 수 있다. 또한 본 발명에서는 본 발명의 신선 NK 세포, 냉장보관 NK 세포, 및 냉동보관 NK 세포를 세포치료제 약학적 조성물로 사용할 때 우수한 효과를 나타내는 용법 및 용량을 확립하였다.

(52) CPC특허분류

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2501/2321 (2013.01)

C12N 2506/115 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포만을 제거하여 CD3 음성세포를 획득하는 단계;
 - 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21를 혼합처리한 후 배양하여 NK세포로 분화시키는 단계;
 - 3) 단계 2)의 NK세포를 무혈청(Serum-Free), 무단백질(protein-Free), 및 무-동물성 요소(Animal component-free) 조건에서 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)가 포함된 냉동보관배지에서 냉동하여, 2개월 이내 기간 동안 냉동보관하는 단계로서, 상기 냉동은 -70℃에서 -200℃로 단계적으로 온도를 낮춤으로써 수행되는 단계; 및
 - 4) 단계 3)에서 냉동보관된 NK 세포를 37℃에서 급속 해동하고 냉동보관배지를 세척하여 제거하는 단계를 포함하는 냉동 후 해동된 NK 세포의 제조방법으로서,
- 상기 단계 1)은 CD3 양성인 T 세포와 적혈구가 교차결합하도록 한 후 원심분리시 밀도구배를 이용하여 CD3 음성세포를 분리함으로써 수행되고, 상기 단계 2)는 IL-15 및 IL-21 이외에 다른 사이토카인이 포함되지 않는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 배양은 10일 내지 24일간 수행되는 것을 특징으로 하는, 냉동 후 해동된 NK 세포의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 3)의 냉동은 이소프로필 알코올(Isopropyl alcohol)이 포함된 냉동 보관 상자를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 냉동 후 해동된 NK 세포의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단계 3)의 냉동은 동결보호제를 더 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 냉동 후 해동된 NK 세포의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 동결보호제는 글라이세롤, 설탕, 글루코스 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 냉동 후 해동된 NK 세포의 제조방법.

청구항 6

- 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포만을 제거하여 CD3 음성세포를 획득하는 단계;
 - 2) 단계 1)에서 획득된 CD3 음성세포를 무혈청(Serum-Free), 무단백질(protein-Free), 무-동물성 요소(Animal component-free) 조건에서 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)가 포함된 냉동보관배지에서 냉동하여, 2개월 이내 기간 동안 냉동보관하는 단계로서, 상기 냉동은 -70℃에서 -200℃로 단계적으로 온도를 낮춤으로써 수행되는 단계;
 - 3) 단계 2)에서 냉동보관된 CD3 음성세포를 해동하는 단계; 및
 - 4) 단계 3)의 해동된 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21를 혼합처리한 후 배양하여 NK세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 냉동 후 해동된 CD3 음성세포로부터 NK 세포를 제조하는 방법으로서,
- 상기 단계 1)은 CD3 양성인 T 세포와 적혈구가 교차결합하도록 한 후 원심분리시 밀도구배를 이용하여 CD3 음성세포를 분리함으로써 수행되고, 상기 단계 4)는 IL-15 및 IL-21 이외에 다른 사이토카인이 포함되지 않는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 획득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양 치료를 위해 수술, 방사선 치료, 화학요법 등의 다양한 치료법이 발전해 왔으나, 종양에 따라서는 빈번한 재발이 심각한 문제가 되고 있다. 이에 따라 환자의 면역기능을 이용한 세포치료의 가능성이 제기되었다.

[0003] 종양을 제거하는 면역반응은 다양한 기능을 가진 면역세포들의 복잡한 상호작용을 통해 일어난다. 종양세포를 직접 제거하는 면역세포로는 NK 세포(natural killer cell, 이하 NK cell)와 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)가 있으며, 이들 효력세포(effector cell)에게 항원을 제시해 주는 항원제시세포로는 수지상세포(dendritic cell, DC)나 B 세포가 있고, 이 외에 다양한 사이토카인(cytokine)을 분비하는 보조 T 세포(helper T cell), 조절 T 세포(regulatory T cell) 등이 함께 작용하게 된다.

[0004] 상기 면역체계를 구성하는 세포들 중 NK 세포는 림프구의 일종으로 인체 내 골수, 비장, 말초 림프절 및 말초

혈액에 분포하며, 말초 혈액의 경우 림프구의 약 10%가 NK 세포인 것으로 알려져 있다(ann Rev Immunol., 24: 257-286, 2006). NK 세포는 CD56 및 CD16이 양성이나, CD3에는 음성을 나타낸다. T 세포와는 달리 NK 세포는 이전에 노출되었던 자극이나 MHC에 제한 없이 종양세포 또는 바이러스에 감염된 세포를 살해하며 세포 클론에 따른 수용체 재배열^a 나타나지 않는다(Trends Immunol., 22: 633-640, 2001). NK 세포가 세포를 살해하는 과정은 퍼포린(perforin) 및 그랜자임(granzyme)을 포함하는 세포질 과립의 배출과 FasL 및 TRAIL을 포함하는 과정과 관련되어 있다. NK 세포는 다양한 사이토카인, 특히 IFN- γ , INF- α , GM-CSF 및 IL-10을 분비하고, 세포 표면에 여러 수용체를 발현하는데 이들 수용체는 세포 흡착, 세포 살해능력의 활성화, 또는 세포 살해능력의 억제에 관여한다. 또한, NK 세포는 MHC class I 분자를 KIR(killer immunoglobulin-like receptor)를 통하여 인지하는데, 대다수의 KIR은 세포 살해억제 수용체이고, 이러한 억제 수용체가 MHC 분자로 인지되지 않으면 세포의 살해가 일어나게 된다.

[0005] 이러한 NK 세포의 살해능은 림프카인 활성화세포(lymphokine activated killer cell, LAK) 및 종양침윤림프구(tumor infiltration lymphocytes, TIL)를 이용하여 고형암 치료에 이용하거나, 공여자 임파구 주입(donor lymphocyte infusion)을 통한 면역치료법(Tilden. A.B. et al., *J. Immunol.*, 136: 3910-3915, 1986; Bordignon C. et al., *Hematologia*, 84: 1110-1149, 1999)을 수행함으로써, 골수이식이나 장기 이식시 발생하는 거부반응을 방지하기 위한 새로운 세포치료 요법으로 응용이 시도되고 있다. 또한, NK 세포의 분화와 활성의 결합이 유방암(Konjevic G. et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 66: 255-263, 2001), 흑색종암(Ryuke Y. et al., *Melanoma Res.*, 13: 349-356, 2003), 폐암(Villegas FR., et al., *Lung Cancer*, 35: 23-28, 2002) 등 다양한 암 질환과 관련되어 있음이 보고되어 이러한 질환들을 치료하기 위해 NK 세포 치료법이 대두되고 있다.

[0006] 그러나, 정상 상태에서 체내에 존재하는 대부분의 NK 세포는 비활성화 상태(inactivated state)로 존재하지만, 실제로 NK 세포를 치료용으로 이용하기 위해서는 활성화된 NK 세포가 필요하기 때문에 정상혈액으로부터 또는 비활성화된 환자 혈액으로부터 NK 세포를 활성화 시키는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0007] 체외에서 NK 세포를 활성화시킴으로써 달성된 NK 세포의 높은 세포독성(cytotoxicity)은 NK 세포의 면역세포 치료 가능성을 확인시켜 주었다. 체외에서 활성화된 NK 세포는 다양한 암 종류, 특히 백혈병과 같은 혈액암을 대상으로 동종 골수이식 후에 투여함으로써 그 치료효과를 확인한 보고(*Blood Cells Molecules & Disease*, 33: 261-266, 2004)가 있다. 그러나, 혈액암이 아닌 고형암에 대해서는 NK 세포에 대하여 아직 임상적으로 뚜렷한 치료 효과가 입증되지 않고 있다. 구체적으로 NK 세포를 종양이 생기기 전부터 투여하여 종양의 성장을 방해할 수 있다는 보고가 있으나(*Cancer Immunol. Immunother.*, 56(11): 1733-1742, 2007), 적합한 치료모델이라고 보기 어렵고, 복강으로 NK 세포를 투여하여 유방암 세포의 성장을 저해한 동물 실험결과도 있으나, NK 세포에 의한 효과인지 불분명하다(*Breast Cancer Res. Treat.*, 104(3): 267-275, 2007).

[0008] 또한, NK 세포를 항암 면역 세포치료로 효과적으로 이용하기 위해서는 많은 수의 NK 세포 확보가 필요하다. 그러나 NK 세포는 혈액 내 림프구의 10 ~ 15%를 차지하고 있고 암 환자에서는 종종 NK 세포의 수, 분화 및 기능이 저하되어있어 사실상 충분한 세포수의 확보가 어려운 실정이다. 그러므로 NK 세포의 증식 또는 분화를 통한 NK 세포의 다량 확보가 절실히 요구되고 있다.

[0009] NK 세포는 골수의 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell, HSC)로부터 유래된다고 알려져 있다. 시험관내(*in vitro*)에서는 제대혈로부터 조혈줄기세포를 분리하여 적당한 사이토카인들을 처리하여 배양함으로써 NK 세포로 분화시키는 방법들이 보고되었다(Galy et al., *Immunity* 3: 459-473, 1995; Mrozek E, et al., *Blood* 87:2632-2640, 1996; Sivori, S. et al., *Eur J Immunol.* 33:3439-3447, 2003; B. Grzywacz, et al., *Blood* 108: 3824-3833, 2006). 즉, CD34⁺ HSC에 Flt-3L, IL-7, SCF 및 IL-15을 첨가하여 5주 배양 후 CD3⁻CD56⁺의 NK 세포로 분화시킬 수 있다. 그러나 이런 분화 방법은 치료에 충분한 양의 세포를 얻기 힘들고 분화하는데 시간과 비용이 많이 요구되는 등의 실제 임상 적용에 대한 어려움이 있다.

[0010] 사이토카인(Cytokine) 수용체의 γ_c 의 발현이 결핍된 쥐에서 B세포와 T세포는 발견이 되지만 NK 세포는 발견되지 않는 점에서 γ_c 를 지닌 수용체들이 NK 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Singer, B et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 377-381, 1995). 수용체의 γ_c 형태는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21의 수용체이며, 이 중 IL-2는 성숙된 NK 세포의 증식과 활성화를 증진시키는 기능을 지니고 있음이 보고되고 있다(Shibuya, A. et al., *Blood* 85, 3538-3546, 1995). IL-2가 결핍된 인간과 마우스에서는 NK 세포의 수가 현저히 감소한다는 보고가 전해지고 있으나(DiSanto, J. P. et al., *J. Exp. Med.* 171, 1697-1704, 1990), 한편으로는 IL-2 및 IL-2Ra 결핍은 간접적으로 NK 세포의 수와 활성화에 영향을 미친다는 연구 결과도 있다. 게다가,

IL-2R(IL-2 receptor) 사슬은 IL-15의 수용체를 형성하는데 관여한다고 알려져 있다.

[0011] IL-15는 NK 세포 분화에 관여하고, 이것은 IL-15 생성에 요구되는 전사인자인 인터페론-조절 인자 1(interferon-regulating factor-1, IRF-1)이 결핍된 쥐에서는 NK 세포가 결핍되며(Kouetsu et al., *Nature* 391, 700-703, 1998), IL-15 또는 IL-15Ra가 결핍된 쥐에서 NK 세포가 발견되지 않는다는 것에 의해 알게 되었다. 이로써 IL-15는 NK 세포에서 발현되는 IL-15 수용체를 통해서 NK 세포의 성장과 분화를 직접적으로 증진시킨다는 것이 보고되었다(MrozekE et al., *Blood* 87, 2632-2640, 1996).

[0012] IL-21은 활성화된 CD4⁺T 세포에 의해 분비되는 사이토카인이며(Nature, 5:688-697, 2005), IL-21의 수용체(IL-21R)는 수지상세포, NK 세포, T 세포 및 B 세포와 같은 림프구에서 발견되어 있다(Rayna Takaki, et al., *J. Immunol* 175: 2167- 2173, 2005). IL-21은 구조적으로 IL-2 및 IL-15과 매우 유사하며, IL-21R는 IL-2R, IL-15, IL-7R 및 IL-4R 등과 사슬을 공유하고 있다(Asao et al., *J. Immunol*, 167: 1-5, 2001). IL-21은 골수로부터의 NK 세포 전구체의 성숙을 유도하는 것으로 보고되었고(Parrish-Novak, et al., *Nature*, 408: 57-63, 2000), 특히 NK 세포의 사이토카인 생성능 및 세포사멸능과 같은 효과기 기능(effector functions)을 증가시키는 것으로 보고되었으며(M. Strengell, et al., *J Immunol*, 170: 5464-5469, 2003; J. Brady, et al., *J Immunol*, 172: 2048-2058, 2004), CD8⁺T 세포의 효과기 기능도 증가시킴으로써 내재, 적응면역계의 항암반응을 촉진시키는 것으로 보고되었다(Rayna Takaki, et al., *J Immunol* 175: 2167-2173, 2005; A. Moroz, et al., *J Immunol*, 173: 900-909, 2004). 또한, 인간의 말초혈액에서 분리한 NK 세포를 활성화 시키며(Parrish-Novak, et al., *Nature*, 408: 57, 2000), 제대혈에서 분리한 조혈줄기세포로부터 성숙한 NK 세포를 유도하는데 중요한 역할을 하는 것이 보고되었다(J. Brady, et al., *J Immunol*, 172: 2048, 2004).

[0013] 한편, 상기와 같은 NK 세포의 암 치료제로서의 가능성에도 불구하고, 체내에 존재하는 NK 세포의 수가 많지 않아 이를 암 치료제로 사용하기 위해서는 체내에서 충분한 효능을 유지할 수 있을 정도의 대량으로 이를 생산하는 기술이 필수적이다. 그러나, NK 세포는 시험관 내에서 대량 증식 및 배양이 제대로 이루어지지 않는다는 문제점이 있으며, 따라서 실제 유용한 수준으로 NK 세포를 증폭 및 배양하는 기술의 개발이 요구되어 왔으며 이를 위한 많은 연구가 진행되고 있으나, 아직 임상에 적용가능한 수준에는 미치지 못하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 이에, 본 발명자들은 보다 효율적이고 경제적으로 NK 세포를 대량생산하는 방법을 개발하던 중, 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득한 후, 상기 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21 등의 사이토카인을 혼합처리한 후 배양하였을 때, 종래의 NK 세포 제조방법보다 빠른시간 내에 순도 높은 NK 세포를 대량생산할 수 있고, 상기 방법으로 제조된 신선 NK 세포가 대장암, 폐암, 간암 및 췌장암 세포주를 이중이식한 마우스 모델에서 암 세포의 성장을 억제하고, 암 세포 무게를 감소시키며, 백혈병과 같은 혈액암 내에서도 이의 치료효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명의 대량생산 방법으로 생산된 NK 세포가 암 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 방법으로 생산된 NK 세포를 이용하여 실제 암환자를 치료하기 위한 NK 세포의 투여량 및 투여방법을 밝혔다.

[0015] 또한 본 발명자들은 신선 NK 세포를 냉장 보관 또는 냉동 보관하는 조건에 따라 냉장보관 NK 세포 및 냉동보관 NK 세포가 신선 NK 세포와 동등한 수준의 항암 효과를 나타냄을 밝히고, 냉장보관 NK 세포를 단독으로 사용하는 경우, 냉동보관 NK 세포를 단독으로 사용하는 경우, 신선 NK 세포와 혼합하여 사용하는 경우의 투여량 및 투여방법을 밝혔다.

[0016] 또한 본 발명자들은 CD3 음성세포를 냉동 보관하는 조건에 따라 냉동보관된 CD3 음성세포를 해동시켜 신선 NK 세포를 제조할 수 있음을 확인하였다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은

[0018] 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계; 및

[0019] 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21를 혼합처리한 후 배양하는 단계를 포함하는, 신선(fresh) NK 세포의 제조방법으로서,

- [0020] 상기 단계 1)은 CD3 양성인 T 세포와 적혈구가 교차결합하도록 한 후 원심분리 시 밀도구배를 이용하여 CD3 음성세포를 분리함으로써 수행되는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 단계 1)의 CD3 양성인 T 세포와 적혈구가 교차결합하도록 한 후 원심분리 시 밀도구배를 이용하여 CD3 음성세포의 분리는 CD3 음성세포를 이용하는 항체를 이용하여 수행될 수 있으며, 예를 들어 STEMCELL Technologies 사에서 제조, 판매하는 RosetteSep™ Human NK Cell Enrichment Cocktail 이라는 제품을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 제품은 CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b, CD123, 및 글라이코포린 A(glycophorin A)을 인식하는 사합체 항체(tetrameric antibody)의 칵테일(cocktail)이다. CD3 양성 세포, CD4 양성 세포, CD19 양성 세포, CD36 양성 세포, CD66b 양성 세포, CD123 양성 세포는 글라이코포린 A를 발현하는 적혈구와 함께 사합체 항체에 결합하여 교차결합을 이룬다. 그 후 원심분리를 하면 상기 세포들은 밀도구배에 의해 펠렛을 이루고, 상층부에서 CD3 음성인 NK 세포가 고농도로 밀집된 배지를 수득할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 단계 2)의 배양은 세포 수를 1×10^6 개/ml의 농도로 유지하여 배양하는 것일 수 있으나, 세포의 모양 및 활성에 이상을 나타내지 않는 한 통상의 당업자가 임의로 조절할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예로서, 단계 2)의 배양은 10 내지 24일간 배양하는 것일 수 있으나, 배양된 세포가 CD3⁻CD56⁺의 특징을 나타내는 것을 확인함으로써 배양기간을 결정할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 단계 2)의 배양은 세포 수를 1×10^6 개/ml의 농도로 유지하여 배양하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예로서, 단계 2)의 배양은 10 내지 24일간 배양하는 것일 수 있다.
- [0026] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 배양은 정지배양(stationary culture) 또는 부유배양(suspension culture) 방법을 사용할 수 있고, 정지배양은 배양기에 교반(agitating) 또는 진탕(shaking)없이 방치한 상태에서 배양하는 것을 의미하며, 부유배양은 통기(aeration)나 교반 등을 통해 세포들이 반응기의 하부 또는 측면부에 부착되지 않고 현탁된 상태에서 배양하는 것을 의미한다. 또한, 정지배양을 위한 반응기와 부유배양을 위한 반응기는 동일한 것일 수도 있고, 상이한 것일 수도 있다. 예를 들어, 정지배양을 위한 반응기와 부유배양을 위한 반응기가 동일한 것인 경우에는 동일한 반응기에서 정지배양이 완료된 후, 사이토카인 등의 필요한 영양성분을 포함하는 배지를 추가적으로 공급하여 부유배양 방식으로 배양하는 것이 가능하며, 상이한 종류의 배양기를 사용하는 경우에는 정지배양이 완료된 후에 배양물을 부유배양을 위한 반응기로 옮겨 부유배양 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 신선 NK 세포는 CD3⁻CD56⁺인 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 NK 세포는 제대혈, 골수 또는 말초혈액 단핵구로부터 유래한 것이 바람직하나, CD3 음성세포라면 어떤 종류의 세포라도 전구체로 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 상기 방법으로 제조된 신선 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제조한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 “세포치료제(cellular therapeutic agent)”를 의미한다. 본 발명의 용어 “세포치료제(cellular therapeutic agent)”란, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 암은 NK 세포에 의해 치료될 수 있는 암이면 제한이 없으며, 예컨대 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 대장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암, 림프종으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 암일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 신선 NK 세포를 1×10^5 개 이상, 3×10^5 개 이상, 3×10^6 개 이상, 1×10^6 개 이상, 3×10^6 개 이상, 6×10^6 개 이상, 또는 1×10^7 개 이상 포함할 수 있다.

- [0033] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 IL-2를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 14 내지 42일 간격, 바람직하게는 14일 내지 35일 간격, 보다 바람직하게는 14일 내지 30일 간격으로 투여될 수 있다. 그러나 투여 간격은 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 주 1회로 4주 동안 투여되거나, 주 2회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 신선 NK 세포를 3×10^6 개 포함하고, 주 1회로 4주 동안 투여될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조성물은 신선 NK 세포를 3×10^6 개 포함하고, 주 2회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 신선 NK 세포를 6×10^6 개 포함하고, 주 1회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명은
- [0040] 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계;
- [0041] 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21를 혼합처리한 후 배양하는 단계; 및
- [0042] 3) 상기 CD3 음성세포를 15시간 이하 동안 4 °C에서 보관하는 단계를 포함하는, 냉장보관 NK 세포의 제조방법으로서,
- [0043] 상기 단계 1)은 CD3 양성인 T 세포와 적혈구가 교차결합하도록 한 후 원심분리 시 밀도구배를 이용하여 CD3 음성세포를 분리함으로써 수행되는 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 단계 3)의 보관 시간은 15시간 이하, 예를 들어 12시간 이하, 예를 들어 10시간 이하가 될 수 있다. 그러나 보관 시간은 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 냉장보관 NK 세포는 CD3⁻CD56⁺인 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명은 상기 방법으로 제조된 냉장보관 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제조한다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 암일 수 있다. 그러나 암의 종류는 이에 제한되지 않으며, NK 세포에 의해 예방, 개선 또는 치료될 수 있는 암은 모두 포함될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 냉장보관 NK 세포를 1×10^5 개 이상, 3×10^5 개 이상, 3×10^6 개 이상, 1×10^6 개 이상, 3×10^6 개 이상, 6×10^6 개 이상, 또는 1×10^7 개 이상 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 IL-2를 더 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 14 내지 42일 간격, 바람직하게는 14일 내지 35일 간격, 보다 바람직하게는 14일 내지 30일 간격으로 투여될 수 있다. 그러나 투여 간격은 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 주 1회로 4주 동안 투여되거나, 주 2회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 냉장보관 NK 세포를 3×10^6 개 포함하고, 주 1회로 4주 동안 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조성물은 냉장보관 NK 세포를 3×10^6 개 포함하고, 주 2회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 냉장보관 NK 세포를 6×10^6 개 포함하고, 주 1회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0055] 본 발명은

- [0056] 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계;
- [0057] 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21를 혼합처리한 후 배양하는 단계; 및
- [0058] 3) 단계 2)의 배양된 CD3 음성세포를 무혈청(Serum-Free), 무단백질(protein-Free), 무-동물성 요소(Animal component-free) 조건에서 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)가 포함된 냉동보관배지에서 2개월 이내 기간 동안 냉동하는 단계로서, 상기 냉동은 -70℃에서 -200℃로 단계적으로 온도를 낮춤으로써 수행되는 단계를 포함하는, 냉동보관 NK 세포의 제조방법을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 용어 "냉동"이란, 본 발명의 NK 세포를 냉동시키는 행위를 의미한다. 냉동에 사용되는 냉동매체는 다양하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 이소프로필 알코올(Isopropyl alcohol)이 포함된 냉동 보관 상자를 이용하여 수행할 수 있다. 그러나 그 외의 수단을 이용하여 냉동하는 것도 가능하다. 또한 냉동시 세포의 손상을 방지하기 위하여 동결보호제를 포함하는 용액을 사용할 수 있다. "동결보호제"란, 생물세포를 동결상태에서 산재로 보존할 경우, 동해를 경감할 목적으로 매액(媒液)에 첨가시키는 물질을 의미하는데, 상기 동결보호제로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 글라이세롤, 설탕, 글루코스 등을 사용할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 냉동 기간은 2개월 이내, 바람직하게는 6주 이내, 보다 바람직하게는 1개월 이내일 수 있다. 그러나 냉동 기간은 이에 제한되지 않으며, 냉동보관 NK 세포의 효과가 유지되는 범위 내에서 적절히 조정될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 단계 3)의 냉동시 CD3 음성세포의 농도는 1.5×10^7 개/ml일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 발명은
- [0063] 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계;
- [0064] 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21을 처리한 후 배양하는 단계;
- [0065] 3) 단계 2)의 배양된 CD3 음성세포를 무혈청(Serum-Free), 무단백질(protein-Free), 무-동물성 요소(Animal component-free) 조건에서 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)가 포함된 냉동보관배지에서 2개월 이내 기간 동안 냉동하는 단계로서, 상기 냉동은 -70℃에서 -200℃로 단계적으로 온도를 낮춤으로써 수행되는 단계; 및
- [0066] 4) 상기 냉동보관 NK 세포를 37℃에서 급속 해동하고 냉동보관배지를 세척하여 제거하는 단계를 포함하는, 해동된 냉동보관 NK 세포의 제조방법을 제공한다.
- [0067] 본 발명의 용어 "해동"이란, 상기 냉동보관된 NK 세포를 활용하기 위하여, 상온으로 온도를 증가시켜서 세포가 정상적인 생리활성을 나타내도록 하는 행위를 의미한다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 해동된 냉동보관 NK 세포는 $CD3^-CD56^+$ 인 것일 수 있다.
- [0069] 본 발명은 상기 방법으로 제조된 해동된 냉동보관 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제조한다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 암일 수 있다. 그러나 암의 종류는 이에 제한되지 않으며, NK 세포에 의해 예방, 개선 또는 치료될 수 있는 암은 모두 포함될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 해동된 냉동보관 세포를 1×10^5 개 이상, 3×10^5 개 이상, 3×10^6 개 이상, 1×10^6 개 이상, 3×10^6 개 이상, 6×10^6 개 이상, 또는 1×10^7 개 이상 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 증류수 또는 무혈청 배지를 더 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 IL-2를 더 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 14 내지 42일 간격, 바람직하게는 14일 내지 35일 간격, 보다 바람직하게는 14일 내지 30일 간격으로 투여될 수 있다. 그러나 투여 간격은 이에 제한되지 않는다.
- [0075] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 주 1회로 4주 동안 투여되거나, 주 2회로 2주 동안 투여되거나, 주 2회로 4주 동안 투여될 수 있다.

- [0076] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 해동된 냉동보관 NK 세포를 3×10^6 개 포함하고, 주 1회로 4주 동안 투여될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조성물은 해동된 냉동보관 NK 세포를 3×10^6 개 포함하고, 주 2회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 해동된 냉동보관 NK 세포를 6×10^6 개 포함하고, 주 1회로 2주 동안 투여될 수 있다.
- [0079] 또한 본 발명은 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계;
- [0080] 2) 단계 1)에서 수득된 CD3 음성세포를 무혈청(Serum-Free), 무단백질(protein-Free), 무-동물성 요소(Animal component-free) 조건에서 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)가 포함된 냉동보관배지에서 2개월 이내로 냉동하는 단계로서, 상기 냉동은 -70°C 에서 -200°C 로 단계적으로 온도를 낮춤으로써 수행되는 단계;
- [0081] 3) 단계 2)에서 냉동된 CD3 음성세포를 해동하는 단계; 및
- [0082] 4) 단계 3)의 해동된 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21를 혼합처리한 후 배양하는 단계를 포함하는, 냉동된 CD3 음성세포로부터 NK 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 방법에 의해 냉동된 CD3 음성세포로부터 제조된 NK 세포는 신선 NK 세포와 동등한 성질 및 효과를 가진다. 따라서 신선 NK 세포와 마찬가지로 암 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [0084] 본 발명은 상기 설명한 본 발명의 방법에 따라 제조된 신선 NK 세포 및 해동된 NK 세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0085] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 신선 NK 세포 및 상기 해동된 NK 세포는 1회 투여량에 각각 1×10^5 개 이상, 3×10^5 개 이상, 3×10^6 개 이상, 1×10^6 개 이상, 3×10^6 개 이상, 6×10^6 개 이상, 또는 1×10^7 개 포함될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 신선 NK 세포 및 상기 해동된 냉동보관 NK 세포는 각각 주 1회로 4주 동안 투여되거나, 주 2회로 2주 동안 투여되거나, 주 2회로 4주 동안 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 신선 NK 세포는 주 1회로 1주 동안 투여되고, 상기 해동된 냉동보관 NK 세포는 주 2회로 3주 동안 투여될 수 있다. 그러나 투여 방법은 적절히 조정될 수 있다.
- [0087] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0088] 본 발명에 의한 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 제제화할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술 분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 약학적 조성물은 액제, 현탁제, 분산액, 유제, 겔제, 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있으며, 바람직하게는 주사제가 될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 약학적 조성물을 주사제로 제제화하는 경우, 주사제 처방의 유통에 따른 제품 안정성을 확보하기 위하여 주사제로 사용가능한 산수용액 또는 인산염 등의 완충용액을 사용하여 pH를 조절함으로써 물리적으로나 화학적으로 매우 안정한 주사제로 제조될 수 있다.

- [0091] 보다 구체적으로, 상기 주사제는 안정화제 또는 용해 보조제와 함께 주사용수에 용해시킨 후, 멸균처리, 특히 고온감압멸균법 또는 무균여과법에 의해 멸균처리하여 제조될 수 있다. 상기 주사용수로는 주사용 증류수 또는 주사용 완충용액, 예를 들어 pH 3.5 내지 7.5 범위의 인산염 완충용액 또는 인산이수소나트륨(NaH_2PO_4)-구연산 완충용액을 사용할 수 있다. 사용되는 인산염은 나트륨염 또는 칼륨염 형태이거나 무수물 또는 수화물 형태이더라도 무방하고, 구연산 또는 무수물 또는 수화물 형태이더라도 무방하다.
- [0092] 또한, 본 발명에서 사용되는 안정화제는 나트륨 피로설파이트(sodium pyrosulfite), 중아황산나트륨(NaHSO_3), 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)을 포함하고, 용해 보조제는 수산화나트륨(NaOH), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(NaCO_3) 또는 수산화칼륨(KOH)과 같은 염기, 또는 염산(HCl) 또는 아세트산(CH_3COOH)과 같은 산을 포함한다.
- [0093] 본 발명에 따른 주사제는 생체흡수성, 생체 분해성, 생체적합성으로 제형화될 수 있다. 생체흡수성이라 함은 주사제가 체내에서, 분산된 주사제의 분해 또는 분해 없이, 초기 적용에서 사라질 수 있음을 의미하는 것이다. 생체 분해성은 가수분해 또는 효소 분해에 의해 주사제가 체내에서 과쇄 또는 분해될 수 있음을 의미한다. 생체적합성은 성분 모두가 체내에서 무독성임을 의미한다.
- [0094] 본 발명에 따른 주사제는 통상의 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 계면활성제 등의 희석제, 또는 부형제 등을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 조성물 또는 유효성분은 목적에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 피하, 자궁내 경막, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로 등을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 정맥내로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물 또는 유효성분은 주사 또는 카테터로 투여될 수 있다.
- [0096] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 체중 60 kg 성인기준으로
- [0097] $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{50}$ 개 / kg, 바람직하게는 $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{30}$ 개 / kg, 보다 바람직하게는 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^{20}$ 개 / kg, 가장 바람직하게는 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ 개 / kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 조성물에 있어서 유효성분은, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 본 발명의 조성물은 1 이상의 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0100] 본 발명은 신선 NK 세포를 암 치료가 필요한 대상체에게 치료학적으로 유효한 양으로 투여하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0101] 본 발명에 있어 암 치료가 필요한 대상체는 인간을 포함하는 포유류가 될 수 있다. 예를 들어 인간, 개, 고양이, 말 등이 될 수 있다.
- [0102] 본 발명은 냉장보관 NK 세포를 암 치료가 필요한 대상체에게 치료학적으로 유효한 양으로 투여하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0103] 본 발명은 해동된 냉동보관 NK 세포를 암 치료가 필요한 대상체에게 치료학적으로 유효한 양으로 투여하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0104] 본 발명의 용어 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 기타 임상의로 인해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분들에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.
- [0105] 본 발명은 암 치료를 위한 의약을 제조하기 위한 신선 NK 세포의 용도를 제공한다.
- [0106] 본 발명은 암 치료를 위한 의약을 제조하기 위한 냉장보관 NK 세포의 용도를 제공한다.

[0107] 본 발명은 암 치료를 위한 의약을 제조하기 위한 해동된 냉동보관 NK 세포의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0108] 본 발명의 방법을 이용하면 신선 NK 세포를 종래의 방법보다 빠른 시간 내에 고순도로 수득할 수 있으며, 또한 신선 NK 세포와 동등한 효능을 갖는 냉장보관 NK 세포, 냉동보관 NK 세포를 제조할 수 있다. 더 나아가 냉동보관된 CD3 음성세포로부터 신선 NK 세포와 동등한 효능을 갖는 NK 세포를 제조할 수 있다.

[0109] 본 발명의 방법에 의해 제조된 신선 NK 세포, 냉장보관 NK 세포, 및 냉동보관 NK 세포는 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병을 포함하는 다양한 암에 대해 치료 효과를 나타내어 세포치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0110] 또한 본 발명에서는 본 발명의 신선 NK 세포, 냉장보관 NK 세포, 및 냉동보관 NK 세포를 세포치료제 약학적 조성물로 사용할 때 우수한 효과를 나타내는 용법 및 용량을 확립하였다.

도면의 간단한 설명

[0111] 도 1은 배양 후 11일 내지 21일 사이에 제대혈 (도 1의 상단) 혹은 말초혈액 (도 1의 하단)에서 분리된 CD3 음성세포로부터 NK 세포로 분화가 유도된 것을 FACS로 확인한 도이다.

도 2a는 배양 10일째 신선 NK세포(Fresh NK cell, 10 일차)를 냉동보관한 후 다시 해동시킨, 해동된 냉동보관 NK세포의 해동 직후의 생존율을 나타낸 도이고, 도 2b는 분화도를 나타낸 도이며, 도 2c는 NK세포 수용체를 나타낸 도이고, 도 2d는 살상능을 확인한 도이다.

도 2e는 냉동 후 해동시킨 CD3 음성세포를 분화시켜 제조한 NK세포의 해동직후 세포 회수율을 확인한 도이고, 도 2f는 해동후 배양시 세포 수의 증가율을 확인한 도이며, 도 2g는 생존율을 확인한 도이고, 도 2h는 분화도 및 NK 세포 수용체를 확인한 도이다.

도 3a는 NK 세포(natural killer cell; 자연살해세포)에 대한 농도별 검출한계 측정을 위해 마우스 체내에서 NK 세포의 검출을 확인한 도이다:

V.C(5% HSA): 용매대조군.

도 3b는 NK 세포에 대한 농도별 검출한계 측정을 위해 마우스의 복부 내 주요 장기들을 적출하여 NK 세포의 검출을 확인한 도이다:

V.C(5% HSA): 용매대조군.

도 3c는 NK 세포의 조직 내 분포를 확인하기 위하여 마우스의 복부 내 주요 장기들을 적출하여 NK 세포의 분포를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군.

도 3d는 시간에 따른 NK 세포의 마우스 체내 분포를 확인한 도이다.

도 4a는 NK 세포 투여에 따른 대장암에 대한 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 4b는 NK 세포 단독 또는 IL-2와 병용처리시, NK 세포 수에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군, 및

ADR: 아드리아마이신(adriamycin) 처리군.

도 4c는 NK 세포 단독 또는 IL-2와 병용처리시, NK 세포 수에 따른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군, 및

ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 5a는 NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 5b는 NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

- V.C: 용매대조군,
- NK-F: 신선(fresh) NK 세포 처리군,
- NK-W/oR-F: 신선 NK 세포(Rosettesep 없음, 즉 w/o Rosettesep) 처리군,
- NK-4°C: 4°C 냉장보관된 NK 세포 처리군,
- NK-W/oR-4°C: 4°C 냉장보관된 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군, 및
- ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 5c는 NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

- V.C: 용매대조군,
- NK-F: 신선(fresh) NK 세포 처리군,
- NK-W/oR,F: 신선 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군,
- NK-4°C보관: 4°C 냉장보관된 NK 세포 처리군,
- NK-W/oR,4°C보관: 4°C 냉장보관된 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군, 및
- ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 6a는 NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 6b는 NK 세포의 냉동 여부에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

- V.C: 용매대조군,
- NK 세포-생(Live)(4): 신선 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,
- NK 세포-생(Live)(1)+(3)동결: 신선 NK 세포주를 1회 및 해동된 냉동보관 세포주를 3회 혼합 투여한 투여군,
- V.C(무혈청 배지): 무혈청 배지 대조군,
- NK 세포-동결(4): 해동된 냉동보관 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,
- NK 세포-동결(8): 해동된 냉동보관 NK 세포주를 8회 투여한 투여군, 및
- ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 6c는 NK 세포의 냉동 여부에 따른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

- V.C: 용매대조군,
- NK 생(Live)(4): 신선 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,
- NK 생(Live)(1)+(3)동결: 신선 NK 세포주를 1회 및 해동된 냉동보관 세포주를 3회 혼합 투여한 투여군,
- V.C(무혈청 배지): 무혈청 배지 대조군,
- NK 동결(4) 세포: 해동된 냉동보관 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,
- NK 동결(8) 세포: 해동된 냉동보관 NK 세포주를 8회 투여한 투여군, 및
- ADR 2mpk: 아드리아마이신 처리군.

도 7a는 NK 세포의 냉동여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 항암효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 7b는 NK 세포의 냉동여부 및 세포 수와 투여횟수에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다.

- V.C(5% HSA): 용매대조군

NK 신선(4) 세포: 신선 NK 세포주를 4주 동안 4회 투여한 투여군

NK 신선(2) 세포: 신선 NK 세포주를 4주 동안 2회 투여한 투여군

NK 신선(1)+(6) 동결세포: 신선 NK 세포주를 1회 투여 한 후 해동된 냉동보관 세포주를 6회 혼합 투여한 투여군
독소루비신. HCL

V.C(무혈청 배지): 무혈청 배지 대조군

NK 동결(8) 세포(무혈청 배지): 무혈청 배지에 해동된 냉동보관 NK 세포주를 8회 투여한 투여군

V.C(증류수): 멸균 증류수 대조군

NK 동결(8) 세포(증류수): 멸균 증류수에 해동된 냉동보관 NK 세포주를 8회 투여한 투여군

도 7c는 NK 세포의 냉동여부 및 세포 수와 투여횟수에 따른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다.

V.C(5% HSA): 용매대조군

NK 신선(4) 세포: 신선 NK 세포주를 4주 동안 4회 투여한 투여군

NK 신선(2) 세포: 신선 NK 세포주를 4주 동안 2회 투여한 투여군

NK 신선(1)+(6)동결 세포: 신선 NK 세포주를 1회 투여 한 후 해동된 냉동된 세포주를 6회 혼합 투여한 투여군
독소루비신.HCL: 독소루비신.HCL

V.C(무혈청 배지): 무혈청 배지 대조군

NK 동결(8) 세포: 무혈청 배지에 해동된 냉동보관 NK 세포주를 8회 투여한 투여군

V.C(증류수): 멸균 증류수 대조군

NK 동결(8) 세포: 멸균 증류수에 해동된 냉동보관 NK 세포주를 8회 투여한 투여군

도 8a는 NK 세포의 세포 수에 따른 폐암에 대한 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 8b는 NK 세포의 세포 수에 따른 폐암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군, 및

Dox.hcl: 독소루비신.HCL.

도 8c는 NK 세포의 세포 수에 따른 폐암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군, 및

Dox.hcl: 독소루비신.HCL.

도 8d는 NK 세포가 종양 부위로 침윤하는 것을 확인하기 위해 H-E 염색을 수행한 도이다:

V.0 : 무혈청 배지 대조군,

화살표: 죽은 암세포, 및

CA: 암 세포.

도 8e는 NK 세포가 종양 부위로 침윤하는 것을 확인하기 위해 CD56을 확인한 도이다:

V.0: 무혈청 배지 대조군,

화살표: CD56 양성세포, 및

CA: 암 세포.

도 9a는 NK 세포의 폐암, 간암 및 췌장암에 대한 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다:

CB NK 세포: 제대혈 유래 NK 세포, 및

PBL NK 세포: 말초혈액 유래 NK 세포.

도 9b는 NK 세포의 폐암(A549), 간암(SNU-709) 및 췌장암(MIA-PaCa-2)에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

CB NK 세포: 제대혈 유래 NK 세포, 및

PBL NK 세포: 말초혈액 유래 NK 세포.

도 9c는 NK 세포의 폐암(A549), 간암(SNU-709) 및 췌장암(MIA-PaCa-2)에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

CB NK 세포: 제대혈 유래 NK 세포, 및

PBL NK 세포: 말초혈액 유래 NK 세포.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0112] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0113] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0114] <실시예 1> NK 세포의 제조

[0115] 병원으로부터 연구용으로 제공받은 제대혈, 말초혈액(건양대학병원 산부인과 및 충남대학병원 산부인과로부터 제공받은, 각 병원 IRB 심사통과)을 RPMI 1640을 이용하여 2:1로 희석하여 준비한 다음, Ficoll-Paque 상층부에서 상기 준비된 혈액을 조심스레 놓은 후, 2,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 단핵구 세포층(mononuclear cell layer, MNC layer)을 얻었다. 상기 단핵구 세포층으로부터 조심스럽게 취한 세포에서 적혈구를 제거하여 단핵구를 수득하였다. 상기 수득한 단핵구에 CD3 마이크로비드(microbeads)(Miltenyi Biotech)를 첨가하여 표지한 후, 이를 CS 컬럼(column) 및 Vario MACS를 이용하여 CD3 양성세포를 제거하고 CD3 음성세포를 수득하였다. 이는 구체적으로 CD3 마이크로비드(Miltenyi Biotech)가 CD3 ε 사슬(chain)을 인식하여 단핵구로부터 CD3 양성인 세포를 포착하여 자성을 가지게 한 후, 단핵구 중 상기 마이크로비드가 부착된 CD3 양성세포를 자석과 반응하는 MACS 컬럼을 통과시킴으로써 CD3 양성세포는 컬럼에 남아있고 CD3 음성세포만 컬럼을 빠져나와 분리하였다.

[0116] 생리식염수로 희석하고 세포수를 측정하여 수에 따라 CD3 양성세포에 교차결합이 가능한 Rosettesep™을 적정 양 처리하고, 실온에서 혼합하면서 20분간 섞어주었다. 반응이 끝난 혈액을 다시 2배 희석한 후 Ficoll-Paque 용액에 층이 섞이지 않게 중첩한 후, 2,000 rpm에서 20분 내지 30분, 실온, break off로 원심분리하였다. 상층액 제거 후 분리된 단핵구 층을 채취하고 세척하여 CD3음성세포를 수득하였다. RosetteSep 성분은 마우스와 랫트에서 유래된 단클론항체와 글라이코포린(glycoporin) A항체와 지지체 역할을 하는 P9항체 또는 P9 F(ab')항체가 사합체(tetramer)를 형성한 복합체이다. CD3음성 세포가 분리되는 과정은 혈액에 투입된 RosetteSep의 사합 복합체가 혈액내의 CD3 양성 세포와 교차 결합하면서 이뮤노로제트(immunorosette)을 형성하고, Ficoll보다 밀도가 커진 이뮤노로제트는 Ficoll을 이용한 밀도구배 원심분리시 Ficoll의 하부에 위치하게 되고, 상부에는 사합 복합체와 결합하지 않은 CD3 음성세포가 집적되어 분리되는 것이다.

[0117] 상기 분리된 CD3 음성세포를 T75 플라스크 에 1×10^6 세포/ml의 농도로 접종하여 alpha-MEM 완전 배지에 IL-15 및 IL-21을 함께 처리하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 10일에서 21일 동안 배양하였다. 배양하는 동안 세포의 농도가 2×10^6 세포/ml를 넘지 않도록 하며, 초기 사용한 조건의 배지를 사용하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 세포를 나누어 주었다. 4, 8, 14, 18 및 21일에 각각 세포 수를 확인하였고, 4, 8, 14 및 21일 순으로 CD3 및 CD56 항체로 염색하여 CD3⁻CD56⁺인 NK 세포군의 비율을 공지된 방법으로 FACS 분석하였다.

[0118] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 배양 후 11일 내지 21일 사이에 제대혈 (도 1 상단) 및 말초혈액 (도 1 하단) 에서 분리된 CD3 음성세포로부터 NK 세포로 분화가 유도되었음을 확인하였다.

- [0119] <실시예 2> 냉동보관 NK 세포의 제조
- [0120] <2-1> 분화된 NK 세포에서 냉동보관 NK 세포의 제조
- [0121] <실시예 1>의 방법으로 유도된 NK 세포(배양 후 10일)를 냉동 보관하여 냉동보관 NK 세포를 제조하였다. 냉동보관의 조건은 무혈청(Serum-Free), 무단백질(protein-Free), 무-동물성 요소(Animal component-free) 조건에 10%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)가 포함된 냉동보관배지(Cryostor)를 사용하였으며, 분화된 NK 세포를 2.25×10^7 세포/1.5 ml(1.5×10^7 세포/ml)의 농도로 냉동하였다. 이소프로필 알코올(Isopropyl alcohol)이 포함된 냉동보관 상자를 이용하여 냉동을 실시하였으며, 단계적으로 -70°C (Deep freezer)를 거쳐 -200°C (LN2)에 최종 보관되었다.
- [0122] 냉동보관 기간은 평균적으로 1달 동안 진행되었으며, 사용하기 직전 냉동 보관 되었던 NK 세포를 37°C 에서 빠르게 해동하고, 생리식염수를 이용하여 세척하여 냉동보관배지를 제거하는 방법으로 해동을 실시하였다. 해동된 냉동보관 NK 세포는 FACS 분석을 통하여 $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$ 인 NK 세포군의 비율과 NK 수용체의 비율 및 세포 생존율을 확인하였고, CML(Chronic myelogenous leukemia) 세포 주에 대한 살상능을 확인하였으며, 기원이 같은 신선 NK세포(냉동보관되지 않은, 신선 NK 세포)와 그 특징을 비교하였다.
- [0123] 그 결과는 도 2a(1. 생존율), 도 2b(2. 분화도), 도 2c(3. 수용체), 도 2d(4. 살상능)에 나타내었다. 도 2a 내지 2d에서, 해동된 냉동보관 NK세포는 신선 NK 세포와 유사한 특징을 지니는 것이 확인되었다.
- [0124] <2-2> 냉동보관된 CD3 음성 세포에서 NK세포의 제조
- [0125] <실시예 1>에서 제시된 CD3 음성세포를 수득하는 방법과 동일한 방법으로 CD3 음성세포를 제대혈로부터 수득하고, <실시예 2-1>에서 제시한 동일한 냉동보관배지를 이용하여 CD3 음성세포를 냉동 보관하였다. CD3 음성세포의 냉동 보관 농도는 2.25×10^7 세포/1.5ml(1.5×10^7 세포/ml)이며 동결 기간은 약 한 달간 진행되었다.
- [0126] 냉동 보관 된 CD3 음성세포로부터 분화된 NK세포를 얻기 위하여 동결 세포를 해동하고, <실시예 1>에서 제시된 방법과 동일한 방법으로 세포를 배양하였다. 해동 후 0, 2, 4, 7, 9, 12일 순으로 세포의 수와 생존율을 확인하였으며, 0일, 7일, 9일 순으로 $\text{CD3}^-\text{CD56}^+$ 인 NK세포 군의 비율을 FACS를 통하여 분석하였다.
- [0127] 그 결과, 냉동 보관된 CD3 음성세포로부터 얻어진 NK세포는 해동 후 수득된 세포 회수율(도 2e), 세포 수(도 2f), 세포 생존율(도 2g), 및 분화도(도 2h) 모두에서 신선 NK 세포와 유사한 특징을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0128] <실시예 3> NK 세포의 마우스에서 체내 분포도 확인
- [0129] 상기 <실시예 1>에서 제조된 신선 NK 세포의 조직 내 분포도를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [0130] 우선, NK 세포의 분포도 확인을 위해 NK 세포에 DiR을 표지하였는데, 이는 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 의 DiR(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine, Sigma, 미국) 염료와 0.5% 에탄올이 포함된 $1 \times \text{PBS}$ (phosphate buffered saline) 10 ml에 세포 1×10^7 개를 부유하고, 37°C 에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, 반응이 끝난 세포는 $1 \times \text{PBS}$ 로 2번 세척하고, 트립판 블루(trypan blue)로 세포를 염색하여 NK 세포의 체내 분포도를 확인하였다.
- [0131] 상기 DiR로 표지된 NK 세포의 시간별, 날짜별 조직 내 분포도 확인을 위하여 BALB/C 암컷 누드 마우스의 정맥에 5% HSA 또는 DiR이 표지된 NK 세포를 각각 1×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 및 5×10^6 세포의 농도가 되도록 주사하고 일정 시간 후 제조사의 프로토콜에 따라 라이브 애니멀 이미징 시스템(live animal imaging system, PHOTONE IMAGER, Biospace)을 이용하여 마우스 전체 또는 부검을 통해 적출한 주요 장기들(간, 비장, 폐, 심장, 신장)에서 NK 세포의 분포도를 확인하였다.
- [0132] DiR 표지된 NK 세포에 대한 농도별 검출 한계 측정을 위해 DiR 표지된 NK 세포 주입 24시간 후 마우스 체내에서의 분포도를 확인한 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이 5×10^4 세포 이하의 농도군에서는 DiR 표지된 NK 세포의 분포 형태가 뚜렷하게 나타나지 않았으며, 1×10^5 세포 이상의 농도군에서는 마우스 복부를 중심으로 영상신호 정도가 농도 의존적으로 강하게 검출되었다(도 3a). 또한, 복부 내 주요 장기들(간, 비장, 신장, 심장, 폐)을 적출하여 영상을 측정된 결과 5×10^4 세포 이하의 농도 군에서는 폐에서만 DiR 표지된 NK 세포의 약한 분포가

확인되었으나, 1×10^5 세포 이상의 농도 군에서는 간, 비장, 폐에서 영상신호 정도가 농도 의존적으로 강하게 검출되었다(도 3b).

[0133] 다음으로, DiR 표지된 NK 세포의 조직 내 분포도를 확인하기 위하여 1×10^7 세포를 정맥으로 투여한 뒤 30분 및 2시간 후에 이를 측정 한 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이, 측정 시작부터 복부를 중심으로 DiR 표지된 NK 세포의 분포가 강하게 검출되었으며, 30분 및 2시간 후에는 용매 대조군과 비교하여 각각 4 배 및 3.8 배 높은 영상신호가 측정되었다. 또한, 복부를 중심으로 하는 주요 장기들인 간, 비장, 신장, 심장 및 폐를 적출하여 영상을 측정 한 결과 간, 비장 및 폐에서 DiR 표지된 NK 세포의 분포가 강하게 검출되었다(도 3c). 특히 간에서는 30분 및 2시간째에 용매 대조군과 비교하여 각각 9.5배 및 5.1배 정도 높게 영상신호가 측정되었다.

[0134] 이후, DiR 표지된 NK 세포의 정맥투여 1일 후부터 DiR 표지된 NK 세포가 검출되지 않을 때까지 1주에 3회 측정 한 결과, 도 3d에 나타난 바와 같이 투여 후 14일까지는 DiR 표지된 NK 세포가 강하게 검출되었고, 그 이후부터는 영상 신호 정도가 약해지기 시작해서 42일째 측정 한 영상에서는 DiR 표지된 NK 세포가 검출되지 않았다(도 3d). 상기 결과는 본 발명의 체내로 투여된 NK 세포가 생체 내에서 적어도 30일까지 생존하며, 폐, 간, 비장 등에 많이 분포하는 것을 나타낸다.

[0135] <실험예 1> 신선 NK 세포의 투여에 따른 대장암에 대한 항암효과 확인

[0136] <1-1> NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 종양 크기 억제 확인

[0137] 상기 <실험예 1>의 방법으로 제조된 NK 세포의 항암 효과를 확인하기 위하여 인간 유래 대장암 세포주인 SW620 (한국생명공학연구원, 대한민국)을 이종이식한 마우스 모델을 이용하였다.

[0138] 구체적으로, SW620 세포주를 PBS에 2×10^7 세포/ml의 농도로 현탁한 후 마우스당 0.3 ml씩 우측 견갑부와 흉벽 사이의 액와부위 피하에 주입하였다. 암 세포주를 이식하고 2시간 뒤 NK 세포주를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 세포/마우스의 농도로 주사를 개시하였고, 이때 IL-2는 PBS에 희석하여 10,000 u/마우스 의 농도로 처리 하였다. 시험기간 동안 주 1회의 투여 스케줄로 총 4회(0일, 7일, 14일 및 21일)에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사한 뒤, 약물투여 개시일부터 부검일까지 총 7회 종양의 크기변화를 배리어 캘리퍼(verier caliper)를 이용하여 3 방향을 측정 한 뒤 하기의 <수학식 1>의 계산식으로 계산하여 확인하였다.

수학식 1

$$\text{암세포부피} = \frac{(\text{길이} + \text{넓이} + \text{높이})}{2}$$

[0139]

[0140] 그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 세포/마우스의 농도로 주사한 군에서 각각 23.8%, 53.4%($p < 0.001$), 59.4%($p < 0.001$) 및 76.8%($p < 0.001$)의 종양 성장 억제 효과가 확인되었으며, 양성대조군인 아드리아마이신(adriamycin)을 투여한 투여군에서는 58.3%($p < 0.001$)의 종양 성장 억제 효과가 확인되었다. 또한, IL-2를 병용처리하였을 때는 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 세포/마우스의 농도로 주사한 군에서 각각 17.0%, 33.8%($p < 0.01$), 49.8%($p < 0.01$) 및 73.5%($p < 0.001$)의 종양 성장 억제 효과가 확인되었다(도 4b).

[0141] <1-2> NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 종양 무게 감소 확인

[0142] NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 항암효과를 확인하기 위하여 약물을 처리한 마우스에서 종양의 무게를 측정하였다.

[0143] 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 NK 세포 단독, 또는 NK 세포 및 IL-2 병용처리한 뒤, 23일째 마우스를 CO₂ 가스를 이용하여 희생시켜 종양을 분리하여 그 무게를 화학저울(chemical balance)를 이용하여 측정하였고, 사진 촬영 후 액체질소에 고정하였다. 모든 측정 항목들의 값은 t-TEST 통계법을 사용하여 용매 대조군과 투여군을 비교하여 통계학적인 유의성을 검사하였다.

- [0144] 그 결과, 도 4c에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 세포/마우스의 농도로 주사한 군에서 각각 23.4%, 54.0%, 59.1%($p < 0.05$) 및 78.8%($p < 0.01$)의 종양무게 감소 효과를 확인하였다(도 4c). 또한, IL-2를 병용처리하였을 때는 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 세포/마우스의 농도로 주사한 군에서 각각 17.0%, 34.3%, 47.0% 및 75.6%($p < 0.01$)의 종양 무게 감소를 확인하였으며, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 58.2%($p < 0.05$)의 종양무게가 감소함을 확인하였다(도 4c).
- [0145] <1-3> NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 독성 확인
- [0146] 상기 <실험예 1-1>의 마우스에서 NK 세포 단독 또는 IL-2와의 병용 투여에 따른 독성을 확인하기 위하여 마우스의 체중변화 및 일반 증상을 관찰하였다.
- [0147] 그 결과, 용매 대조군과 비교하여 NK 세포 단독 또는 IL-2와의 병용 투여군에서 시험기간 동안 일반 증상 없이 정상적인 체중증가가 관찰되었으나, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 21.8%($p < 0.01$)의 통계적으로 유의한 체중 감소가 나타났다.
- [0148] 결론적으로, 본 발명의 NK 세포는 단독 또는 IL-2와 병용 투여시 일반증상 및 체중감소와 같은 독성을 나타내지 않았으며, 항암 효과와 관련하여 NK 세포 단독 투여군에서 최고 70% 이상의 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타냈고, IL-2와 병용 투여한 군에서는 NK 세포 단독 투여군과 비교하여 첨가 또는 상승의 효과를 나타내지는 않는 것으로 확인되었다.
- [0149] <실험예 2> NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암 효과 확인
- [0150] <2-1> NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 종양 크기 억제 확인
- [0151] 본 발명의 NK 세포의 배양방법(CD3 양성 T 세포를 Rosettesep으로 제거하거나 또는 제거 과정을 생략), 보관 조건(신선 또는 냉장보관) 및 투여 스케줄(주 1회×4주, 주 2회×2주)에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 크기의 감소를 확인하였다.
- [0152] 구체적으로, NK 세포를 배양조건에 따라 신선(fresh) NK, 신선 NK(w/o Rosettesep), 4°C 냉장보관한 NK 및 4°C 냉장보관한 NK(w/o Rosettesep)로 나누었고, 신선 NK 세포는 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 제조되었다. 신선 NK(w/o Rosettesep) 세포는 <실시예 1>과 동일한 방법으로 제조되었으나, CD3 양성 세포를 제거하는 단계를 생략하였고, 4°C 냉장보관한 NK 세포는 신선 NK 세포를 4°C에서 12시간 보관 후 사용한 것이며, 4°C 냉장보관한 NK(w/o Rosettesep) 세포는 CD3 양성 세포를 제거하는 단계를 생략하고 NK 세포를 제조한 뒤, 4°C에서 12시간 보관 후 사용한 것이다. 상기 제조된 NK 세포를 마우스 모델에 투여하기 위해, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 3×10^6 세포/마우스의 농도로 투여하였으며, 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였고, 이때 투여 스케줄은 주 1회×4주, 주 2회×2주로 투여를 수행하였다(도 5a).
- [0153] 시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 NK 세포를 주 1회×4주[신선 NK, 신선 NK(w/o Rosettesep)] 및 주 2회×2주[신선 NK, 신선 NK(w/o Rosettesep), 4°C 냉장보관한 NK, 4°C 냉장보관한 NK(w/o Rosettesep)] 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였으나, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 2수의 사망동물 및 31.5%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 체중감소가 나타났다.
- [0154] 또한, NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위하여 종양의 크기변화를 확인한 결과, 도 5b에 나타난 바와 같이 주 1회×4주 스케줄로 신선 NK 및 신선 NK(w/o Rosettesep)를 3×10^6 세포/마우스의 농도로 투여하였을 때 용매 대조군과 비교하여 각각 50.8%($p < 0.001$) 및 32.7%($p < 0.05$)의 종양성장 억제 효과가 나타났고, 주 2회×2주 스케줄로 신선 NK, 신선 NK(w/o Rosettesep) 및 4°C 냉장보관한 NK 세포를 투여하였을 때 각각 35.4%, 10.8% 및 33.0%의 종양 성장 억제 효과가 나타났다. 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 71.7%($p < 0.01$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다. 그러나 4°C 냉장보관한 NK(w/o Rosettesep) 세포를 투여한 투여군에서는 종양 성장 억제 효과가 나타나지 않았는데, 이로부터 CD3 양성 T세포 제거 과정을 거치지 않은 경우 NK 세포의 비율이 낮아 항암 효과가 떨어지는 것을 알 수 있어, 항암 효과를 높이기 위해서는 CD3 양성 T세포 제거 과정이 필요함을 알 수 있다.
- [0155] <2-2> NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 종양 무게 감소 확인

- [0156] 본 발명의 NK 세포의 배양방법, 보관 조건 및 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 무게의 감소를 확인하였다.
- [0157] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 상기 실험예 <2-1>과 동일한 조건으로 NK 세포를 투여한 뒤, 약물 투여 후 27일째 종양을 절제하여 무게를 측정하였다.
- [0158] 그 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이 주 1회×4주 스케줄로 신선 NK 및 신선 NK(w/o Rosettesep)를 3×10^6 개/마우스의 농도로 투여하였을 때 용매 대조군과 비교하여 각각 49.0%($p < 0.001$) 및 33.1%($p < 0.05$)의 종양무게 감소 효과가 나타났고, 주 2회×2주 스케줄로 신선 NK, 신선 NK(w/o Rosettesep) 및 4℃ 냉장보관한 NK 세포를 투여하였을 때 각각 30.3%, 7.2% 및 29.0%의 종양무게 감소 효과가 나타났으며, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 70.2%($p < 0.05$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 5c).
- [0159] 결론적으로, 상기 결과로부터 주 1회×4주 스케줄로 투여하였을 때 신선 NK 배양조건에서 배양한 NK 세포를 3×10^6 개/마우스의 농도로 투여하였을 때 우수한 항암 효과를 나타내었고, 주 2회×2주 스케줄로 투여한 경우에는 신선 NK(w/o Rosettesep) 및 4℃ 냉장보관한 NK(w/o Rosettesep) 세포주보다 신선 NK 및 4℃ 냉장보관한 NK 세포주에서 높은 항암 활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0160] <실험예 3> NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암효과 확인
- [0161] <3-1> NK 세포의 냉동 여부에 따른 종양 크기 억제 확인
- [0162] 본 발명의 NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 크기의 감소를 확인하였다.
- [0163] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 2시간 뒤 NK 세포를 3×10^6 세포/마우스의 농도로 투여하였으며, 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였고, 이때 신선 NK 세포(주 1회×4주, 총 4회), 해동된 냉동보관 NK 세포(주 1회×4주, 총 4회), 해동된 냉동보관 NK 세포(주 2회×4주, 총 8회), 및 신선 NK 세포(주 1회×1주)+해동된 냉동보관 NK 세포(주 1회×3주, 총 3회)의 조건으로 투여하였다. 용매 대조군으로는 5% HSA와 무혈청 배지(serum free media)를 투여하였고, 양성 대조군으로는 아드리아마이신을 2 mg/kg의 용량으로 격일 복강 투여하였다(도 6a).
- [0164] 시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 모든 NK 세포 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였으나, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 2수의 사망동물 및 32.1%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 체중감소가 나타났다.
- [0165] 또한, NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위하여 27일째의 종양의 크기변화를 확인한 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이 신선 NK 세포(총 4회), 해동된 냉동보관 세포(총 8회), 및 신선 NK 세포(총 1회)+해동된 냉동보관 NK 세포(총 3회)을 투여한 투여군에서 각각 58.8%($p < 0.001$), 45.2%($p < 0.001$) 및 19.2%의 종양 성장 억제 효과를 확인하였고, 양성대조군에서는 60.1%($p < 0.01$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 6b).
- [0166] <3-2> NK 세포의 냉동 여부에 따른 종양 무게 감소 확인
- [0167] 본 발명의 NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 무게의 감소를 확인하였다.
- [0168] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 조건으로 NK 세포를 투여한 뒤, 약물 투여 후 27일째 종양을 절제하여 무게를 측정하였다.
- [0169] 그 결과 도 6c에 나타난 바와 같이, 신선 NK 세포(총 4회), 해동된 냉동보관 NK 세포(총 8회), 및 신선 NK 세포(총 1회)+해동된 냉동보관 NK 세포(총 3회)을 투여한 투여군에서 각각 58.5%($p < 0.001$), 46.2%($p < 0.01$) 및 19.5%의 종양 무게 감소 효과를 확인하였고, 양성대조군에서는 60.5%($p < 0.05$)의 종양 무게 감소 효과를 나타내었다(도 6c).
- [0170] 결론적으로, 상기 결과로부터 신선 NK 세포(주 1회×4주, 총 4회), 해동된 냉동보관 NK 세포(주 2회×4주, 총 8회)를 3×10^6 개/마우스의 농도로 투여 시 일반증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 현저한 항암 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0171] <실험예 4> NK세포의 냉동여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 항암효과 확인

[0172] <4-1>세포의 냉동여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 종양 크기 억제 확인

[0173] 본 발명의 NK세포의 냉동 여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 항암효과를 확인하기 위해 종양 크기 감소를 확인하였다.

[0174] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 2시간 뒤 신선 NK 세포와 해동된 냉동보관 NK 세포를 3×10^6 개/마우스 및 6×10^6 개/마우스의 농도로 투여하였으며, 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였다. 이때 3×10^6 개/마우스 농도의 신선 NK 세포(1회/주 X 4주; 총 4회), 6×10^6 개/마우스 농도의 신선 NK 세포(1회/2주 X 4주; 총 2회), 및 신선 NK 세포 (3×10^6 개/마우스, 1회/주 X 1주) + 해동된 냉동보관 세포(3×10^6 개/마우스, 2회/주 X 3주 ; 총 6회), 해동된 냉동보관 NK 세포(serum free media, 2회/주 X 4주, 총 8회), 해동된 냉동보관 NK 세포(distilled water, 2회/주 X 4주, 총 8회)의 조건으로 투여하였다. 용매대조군으로는 5% HSA와 무혈청배지(Serum free media) 및 멸균증류수(distilled water)를 상기 동일양 미정맥 주사하였으며, 양성 대조군으로 독소루비신.HCL(doxorubicin.HCL)을 2mg/kg용량으로 격일 복강 투여하였다(도 7a).

[0175] 시험 기간 동안 독성 정도를 알아보기 위하여 동물의 체중 변화 및 일반 증상을 관찰한 결과 용매 대조군과 비교하여 모든 NK 세포 주사군에서 일반 증상 없이 정상적인 체중의 증가가 관찰되었으나 양성 대조물질인 독소루비신.HCL을 투여한 투여군에서는 투여기간 동안 2수의 사망 동물 및 최종일 25.0%(p<0.01)의 통계적으로 유의한 체중 감소가 나타났다.

[0176] 또한, NK 세포의 냉동 여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 항암효과를 확인 하기 위하여 26일째의 종양의 크기 변화를 확인한 결과, 도 7b에서 나타난 바와 같이 3×10^6 개/마우스 농도의 신선 NK 세포 (총 4회), 6×10^6 개/마우스 농도의 생 세포(총 2회), 신선 NK 세포(3×10^6 개/마우스;총 1회)+해동된 냉동보관 NK 세포(3×10^6 개/마우스; 총 6회), 해동된 냉동보관 NK 세포(serum free media; 총 8회), 해동된 냉동보관 NK 세포(distilled water; 총 8회)를 투여한 투여군에서 각각 68.3%(p<0.001), 61.5%(p<0.001), 63.7%(p<0.001), 55.1%(p<0.01) 및 38.8%의 종양성장 억제 효과가 관찰 되었다. 양성대조물질(Doxorubicin.HCl) 투여군에서는 최종일 72.9%(p<0.01)의 종양 성장 억제 효과가 나타났다(도 7b).

[0177] <4-2>세포의 냉동여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 종양 무게 감소 확인

[0178] 본 발명의 NK세포의 냉동 여부 및 세포 수와 투여 횟수에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 무게의 감소를 확인하였다.

[0179] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 조건으로 NK세포를 투여한 뒤, 약물 투여 후 26일 째 종양을 절제하여 그 무게를 측정하였다. 그 결과 도 7c에 나타난 바와 같이, 3×10^6 개/마우스의 농도의 신선 NK 세포 (총 4회), 6×10^6 개/마우스의 농도의 신선 NK 세포(총 2회), 신선 NK 세포(3×10^6 개/마우스;총 1회)+ 해동된 냉동보관 NK 세포(3×10^6 개/마우스; 총 6회), 해동된 냉동보관 NK 세포(serum free media; 총 8회), 해동된 냉동보관 NK 세포(distilled water; 총 8회)를 투여한 투여군에서 각각 68.6%(p<0.001), 61.8%(p<0.01), 59.1%(p<0.01), 50.2%(p<0.05) 및 40.8%(p<0.05)의 종양무게 감소가 관찰 되었다. 양성대조물질 (Doxorubicin.HCl) 투여군에서는 70.4% (p<0.01)의 종양무게 감소가 있었다(도 7c).

[0180] 결론적으로, 상기 결과로부터 신선 NK 세포 (주 1회 X 4주; 총 4회, 1회/2주 X 4주; 총 2회), 해동된 냉동보관 NK 세포(serum free media, 주 2회 X 4주; 총 8회) 및 신선 NK 세포 (주 1회 X 1주)+해동된 냉동보관 NK 세포 (주 2회X 3주; 총 6회)를 상기의 농도로 마우스 미정맥 주사 시 일반 증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 통계적으로 유의한 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0181] <실험예 5> NK 세포 수에 따른 폐암에 대한 항암효과 확인

[0182] <5-1> NK 세포 수에 따른 종양 성장 억제 및 종양 무게 감소 효과 확인

[0183] 본 발명의 NK 세포 수에 따라 인체 유래 폐암 세포주인 NCI-H460(한국생명공학연구원, 대한민국)을 이종이식한 마우스 모델을 이용하여 NK 세포주의 용량별 반복 정맥주사를 통한 항암효과를 확인하였다.

[0184] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 개/마우스의 농도로 주사를 개시하였고, 시험기간 동안

주 1회의 투여 스케줄로 총 4회(주 1회)에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였다. 용매 대조군으로는 5% HSA를 투여하였고, 양성 대조군으로는 독소루비신.HCL(doxorubicin.HCL)을 2 mg/kg의 용량으로 격일 복강 투여하였다(도 8a).

[0185] 시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 모든 용량의 NK 세포 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였으나, 양성 대조군인 독소루비신.HCL을 투여한 투여군에서는 43.3%(p<0.001)의 통계적으로 유의한 체중감소가 나타났다.

[0186] 항암 효과 확인을 위해, 상기 <실험예 1>의 방법으로 개시일부터 부검일까지 총 11회에 걸쳐 종양 크기를 확인하였고, 최종일(26일)에 마우스를 희생시켜 종양을 분리한 후 이를 측정하여 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과, 도 8b에 나타난 바와 같이 NK 세포를 1×10^7 개/마우스의 농도로 투여한 투여군에서 용매 대조군과 비교하여 47.9%(p<0.001)의 유의한 종양 성장 억제 효과를 확인하였고, 3×10^5 , 1×10^6 및 3×10^6 개/마우스의 농도로 투여한 투여군에서는 투여 후 10일까지 종양의 성장을 억제하는 것이 확인되었으나, 그 이후에는 억제율이 감소함에 따라 종양의 성장이 증가하는 경향을 나타내었으며, 양성 대조군에서는 53.8%(p<0.001)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 8b).

[0187] 또한, 종양 무게 감소 효과를 확인한 결과, 도 8c에 나타난 바와 같이 NK 세포를 1×10^7 개/마우스의 농도로 투여한 투여군에서 용매 대조군과 비교하여 46.5%(p<0.001)의 유의한 종양 무게 감소 효과를 확인하였고, 양성 대조군에서는 52.4%(p<0.001)의 종양 무게 감소 효과를 나타내었다(도 8c).

[0188] <5-2> 종양 부위로의 NK 세포 침윤 효과 확인

[0189] 상기 실험예 <5-1>의 조건으로 NK 세포를 투여하였을 때, 얼마나 많은 NK 세포가 침윤하는지 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0190] 구체적으로, 마우스의 암 조직을 10% 포르말린 용액에 넣고 4℃에서 12시간 동안 고정을 하였다. 상기 고정된 조직을 얇게 절편을 만들어 PBS 용액에 담근 뒤, NK 세포의 면역조직화학 염색을 위해 상기 조직 절편을 30분 동안 3% 과산화수소 용액에 담근 후, 상기 절편을 다시 0.1 M PBS(pH 7.4), 0.1% 트라이톤 X-100(triton X-100), 소혈청알부민(serum bovine albumin) 및 CD56 항체(1:500, PharMigen, 미국)가 포함된 용액에 넣고 4℃에서 12시간 동안 배양하였다. 그리고나서 상기 절편을 상온에서 1시간 동안 형광표지 항 마우스 IgG(1:200, PharMigen, 미국)가 포함된 용액에 넣고 배양한 뒤 현미경으로 관찰하였다. 또는, 상기 고정된 조직을 바로 H-E(Hematoxylin and Eosin) 염색을 수행하여 이를 현미경으로 관찰하였다.

[0191] 그 결과, 도 8d 및 8e에 나타난 바와 같이 NK 세포주를 3×10^5 , 1×10^6 및 3×10^6 개/마우스의 농도로 1차 투여하였을 때 죽은 암세포의 수(화살표)가 NK 세포를 주입한 개수에 의존적으로 증가하였고(도 8d), NK 세포 마커인 CD56 양성세포 수(화살표)는 정상 대조군으로 용매를 1차 투여한 대조군과 비교하여 현저하게 증가하였으며, CD56 양성 세포들이 주로 암조직 주변에 침윤함을 확인하였다(도 8e).

[0192] 결론적으로, NK 세포를 1×10^7 개/마우스의 농도로 주 1회씩 4주간 마우스의 미정맥 주사시, 일반증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 인체 유래 폐암에 대해 현저한 종양 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0193] <실험예 6> 폐암, 간암 및 췌장암에 대한 NK 세포의 항암 효과 확인

[0194] 다양한 암종에 대한 본 발명의 NK 세포의 항암 효과를 확인하기 위하여, 인간 유래 폐암 세포인 A549(한국생명공학연구원, 대한민국), 간암 세포인 SNU-709(한국생명공학연구원, 대한민국) 및 췌장암 세포인 MIA-Paca-2(한국생명공학연구원, 대한민국) 세포주를 이종이식한 마우스 모델을 이용하여 NK 세포주의 반복 정맥주사를 통한 항암효과를 확인하였다.

[0195] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 6×10^6 개/마우스의 농도로 주사를 개시하였고, 시험기간 동안 주 1회의 투여 스케줄로 총 4회(주 1회)에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였으며, 용매 대조군으로는 5% HSA를 투여하였다(도 9a).

[0196] 시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 모든 용량의 NK 세포 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였다.

[0197] 항암 효과 확인을 위해, 상기 <실험예 1>의 방법으로 개시일부터 부검일까지 총 11회에 걸쳐 종양 크기를 확인

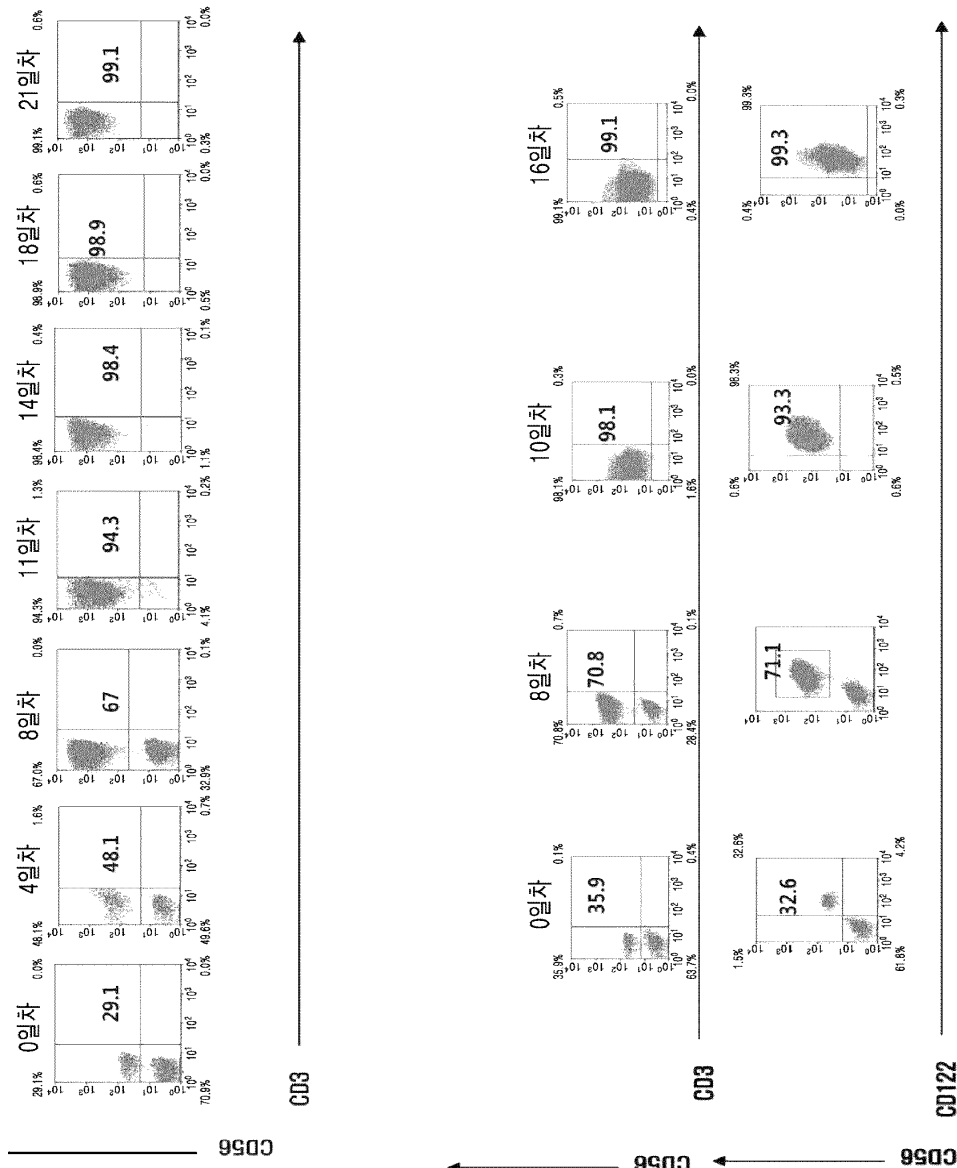
하였고, 최종일(25일)에 마우스를 희생시켜 종양을 분리한 후 이를 측정하여 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과, 도 9b에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 폐암 마우스 모델에서 제대혈 유래 NK 세포주 및 말초혈액 유래 NK 세포주를 투여한 경우 각각 24.7%(p<0.05) 및 9.0%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었고, 간암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 37.7%(p<0.01), 및 췌장암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 28.2%(p<0.01)의 유의한 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 9b).

[0198] 또한, NK 세포 투여 후 25일째 종양 무게 감소 효과를 확인한 결과, 도 9c에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 폐암 마우스 모델에서 제대혈 유래 NK 세포주 및 말초혈액 유래 NK 세포주를 투여한 경우 각각 20.4%(p<0.01) 및 10.8%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었고, 간암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 37.6%(p<0.01), 및 췌장암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 23.9%(p<0.01)의 종양 무게 감소 효과를 나타내었다(도 9c).

[0199] 결론적으로, 본 발명의 NK 세포는 6×10^6 개/마우스의 농도로 주 1회씩 4주간 마우스의 미정맥 주사시, 일반증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 인체 유래 폐암, 간암 및 췌장암에 대해 현저한 종양 억제 효과가 있음을 확인하였다.

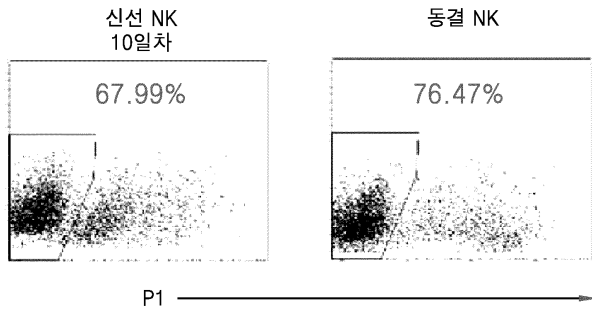
도면

도면1



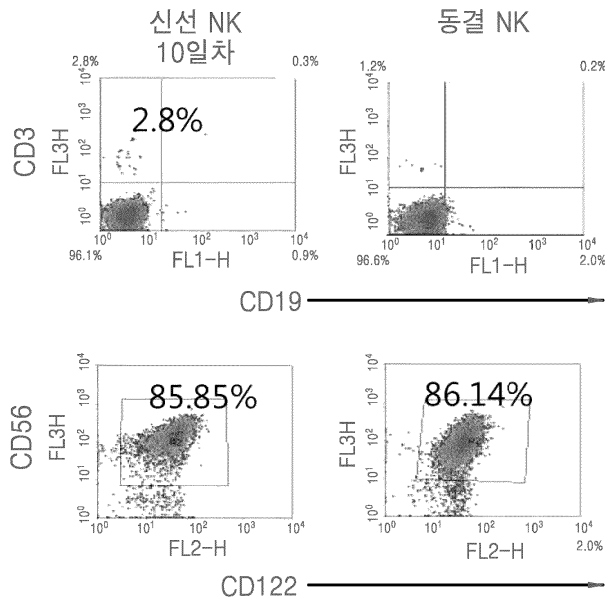
도면2a

1. 생존을 확인



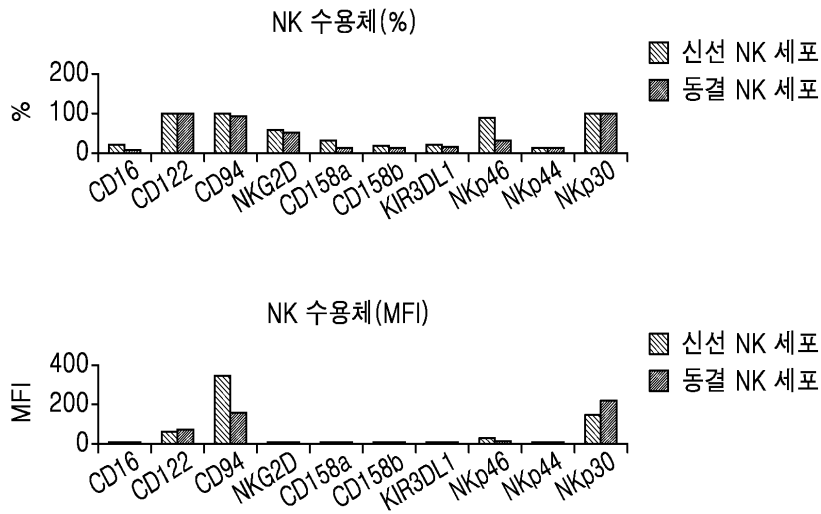
도면2b

2. 분화도 확인 (CD3-CD56+)



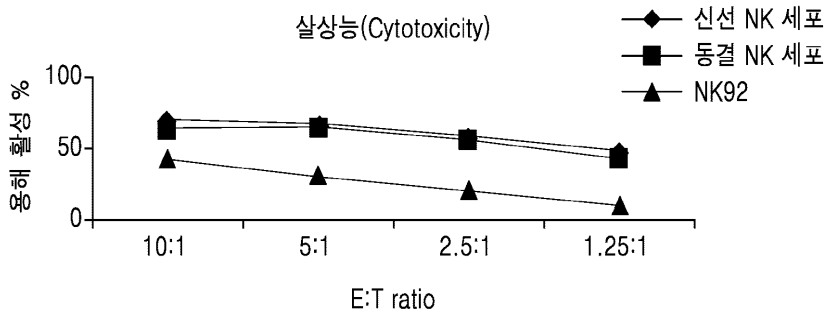
도면2c

3. NK세포 수용체 (NK receptors)



도면2d

4. NK 살상능 (Cytotoxicity)



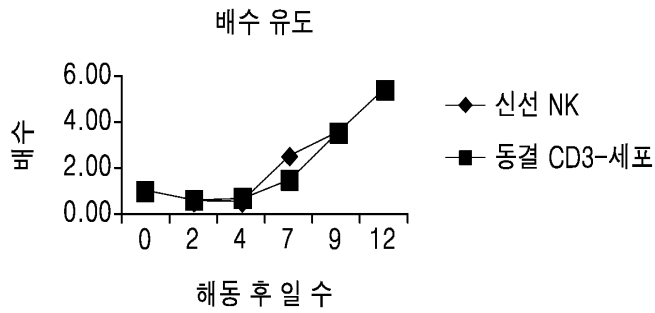
도면2e

1. 해동 후 획득된 세포 회수율

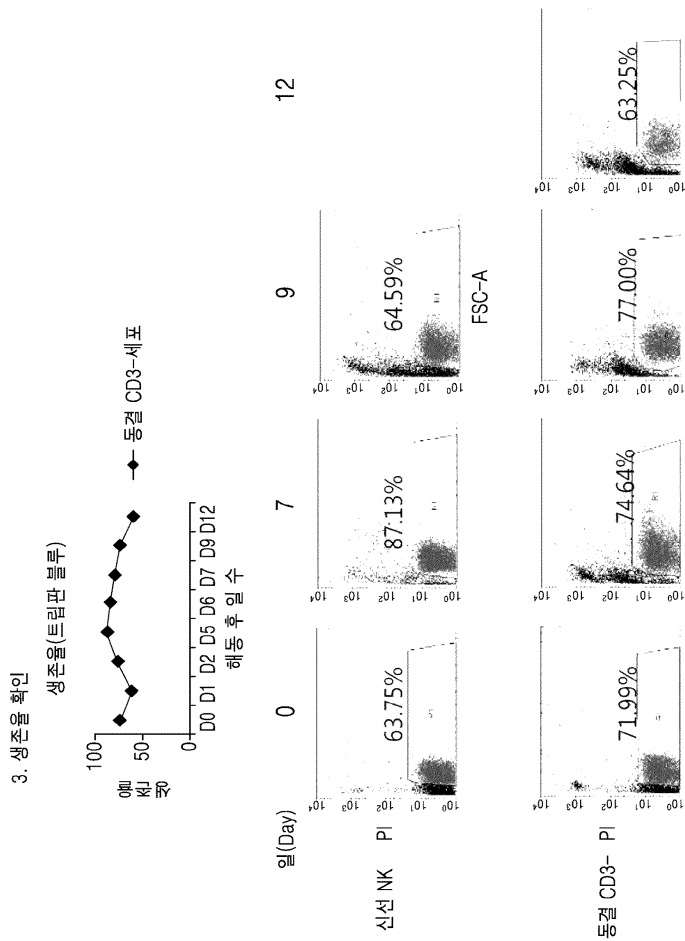
동결 세포 유형	동결 세포 번호	해동 후 세포 번호	회수율
CD3-cells	22.5*10 ⁶	17.3*10 ⁶	76.9%

도면2f

2. 세포 수 확인



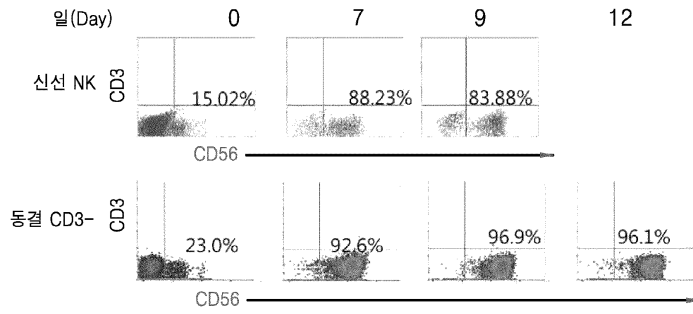
도면2g



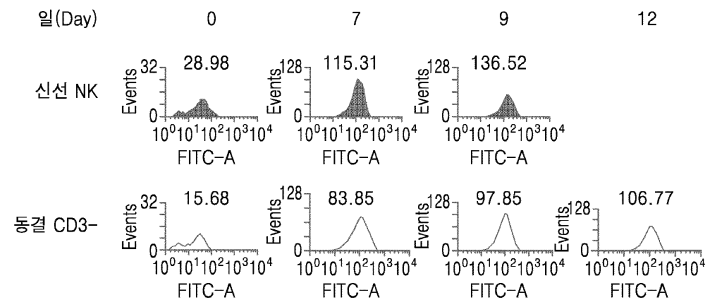
도면2h

4. 분화도 및 NK 수용체 확인

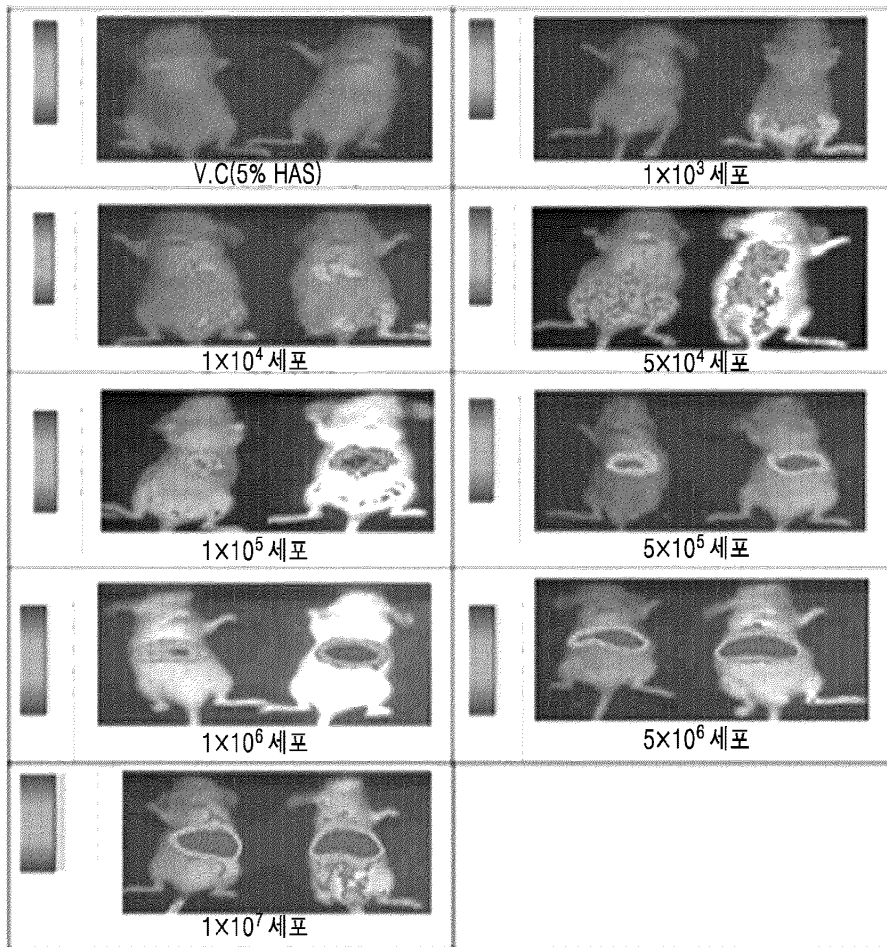
a. 분화도



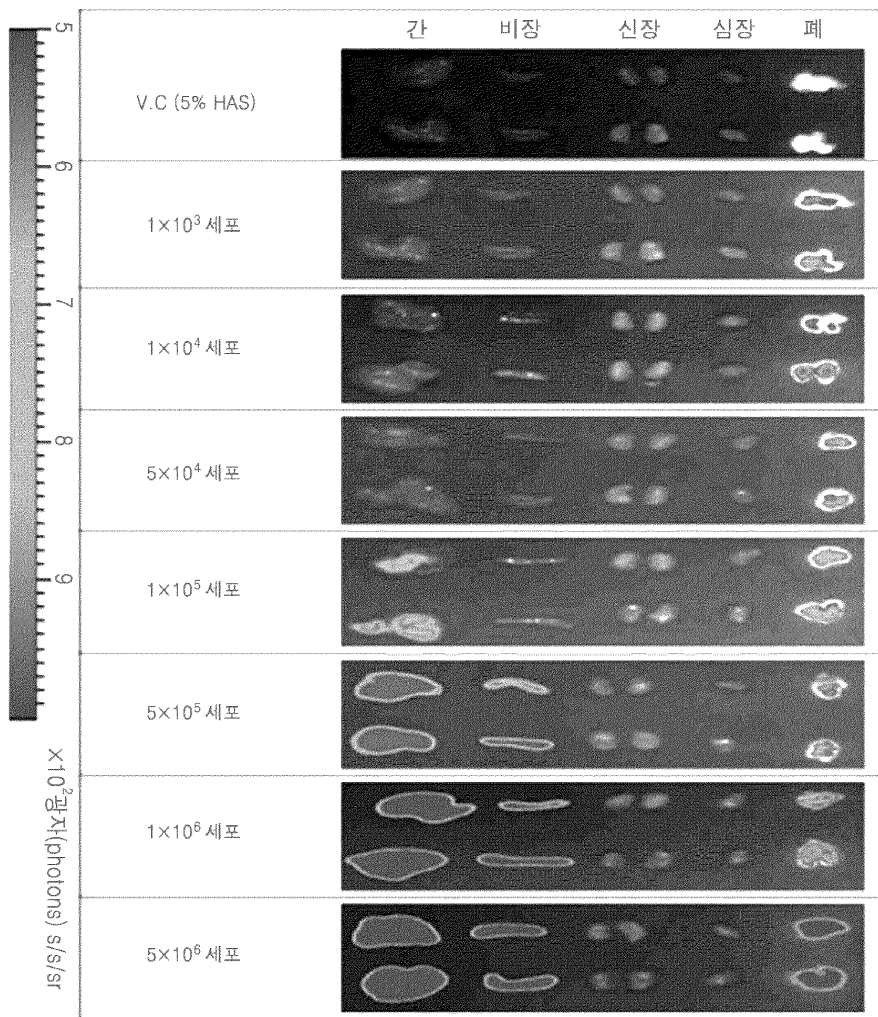
b. NK수용체(CD94)



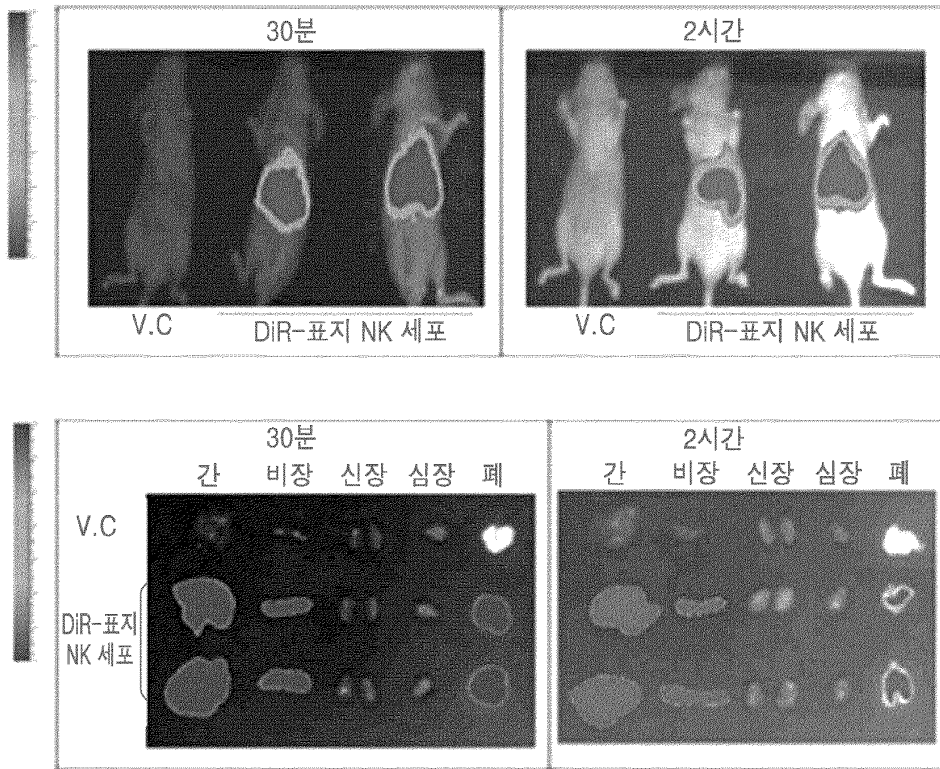
도면3a



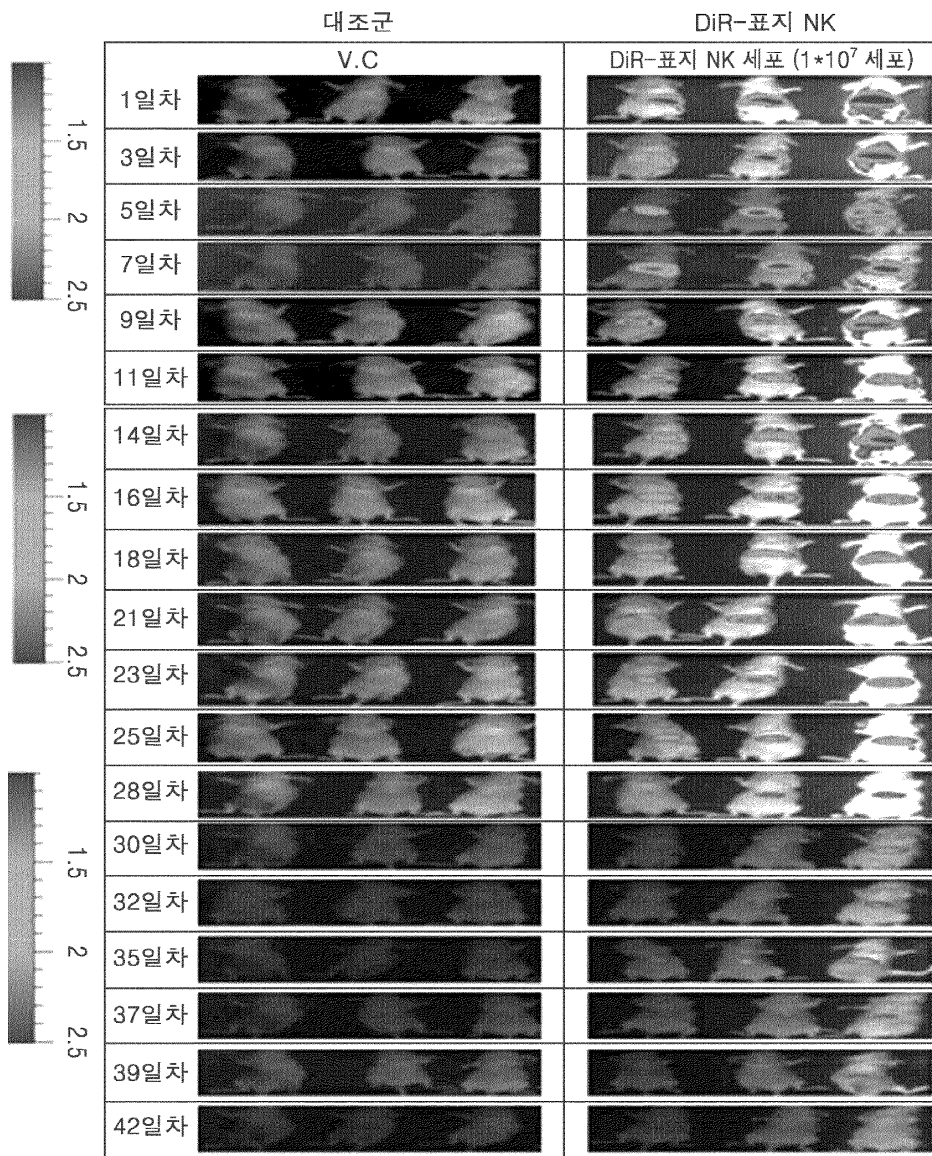
도면3b



도면3c

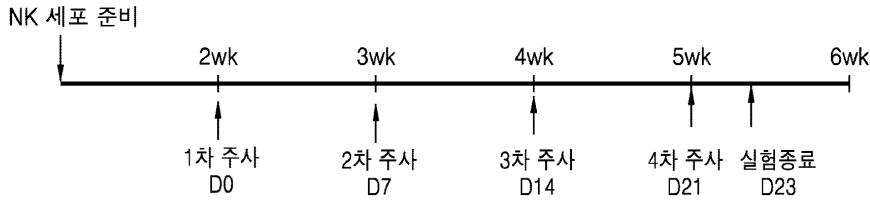


도면3d

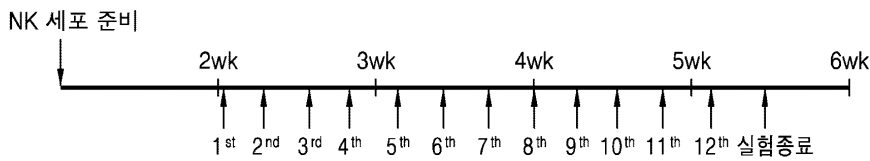


도면4a

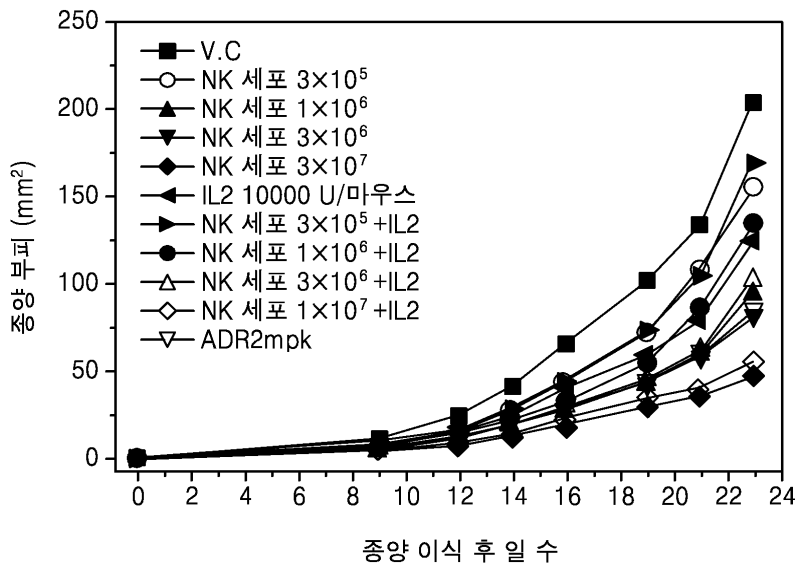
- Group 1,6: 용매 대조군(+ IL-2)
- Group 2,7: NK 3×10^5 (+ IL-2)
- Group 3,8: NK 1×10^6 (+ IL-2)
- Group 4,9: NK 3×10^6 (+ IL-2)
- Group 5,10: NK 1×10^7 (+ IL-2)



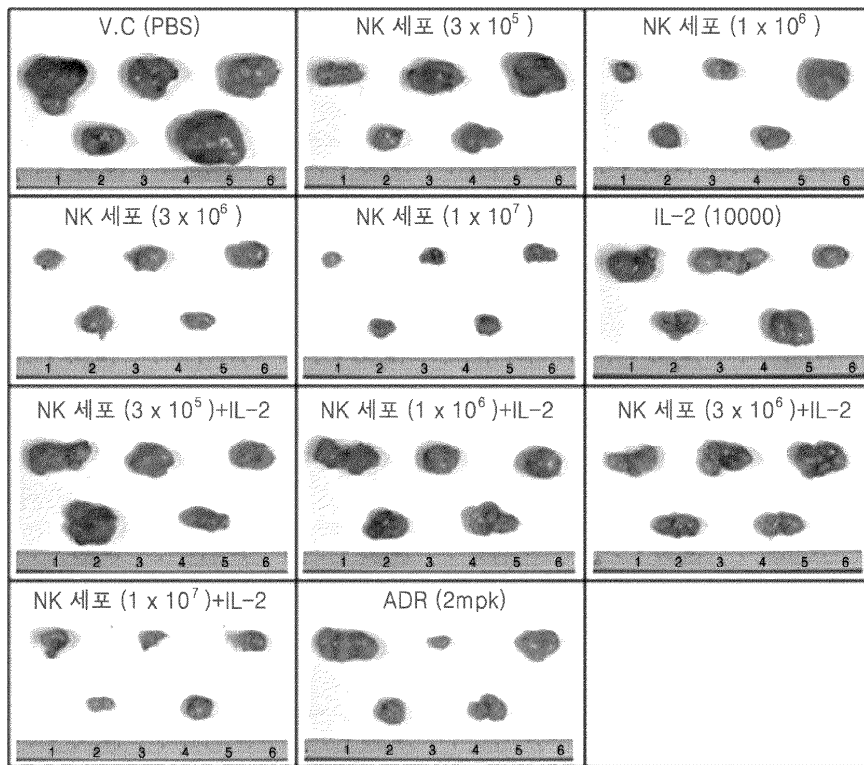
- Group 11 ADR



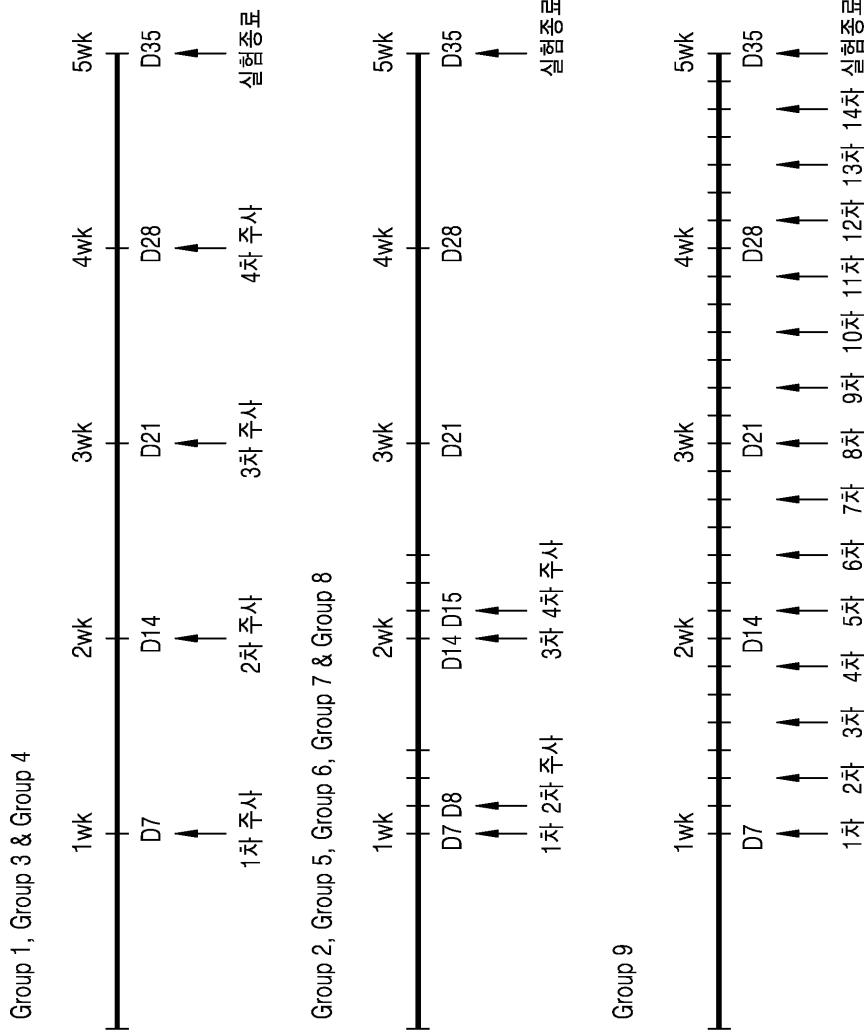
도면4b



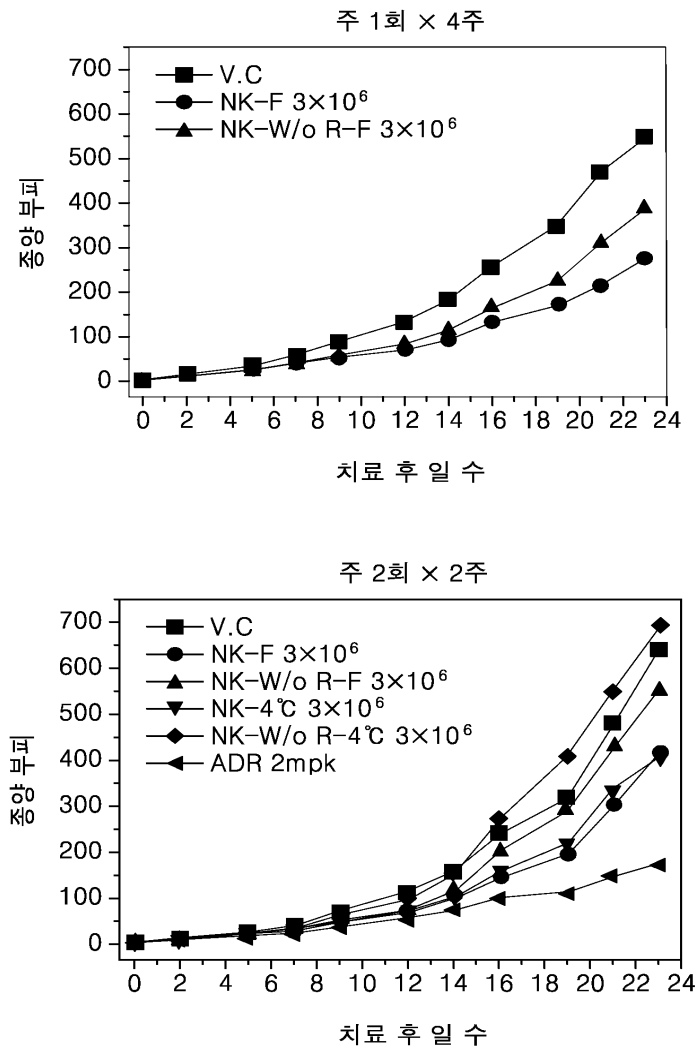
도면4c



도면5a

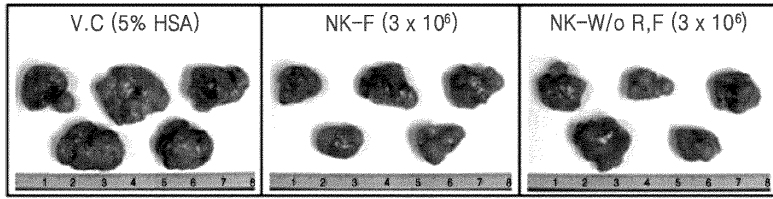


도면5b

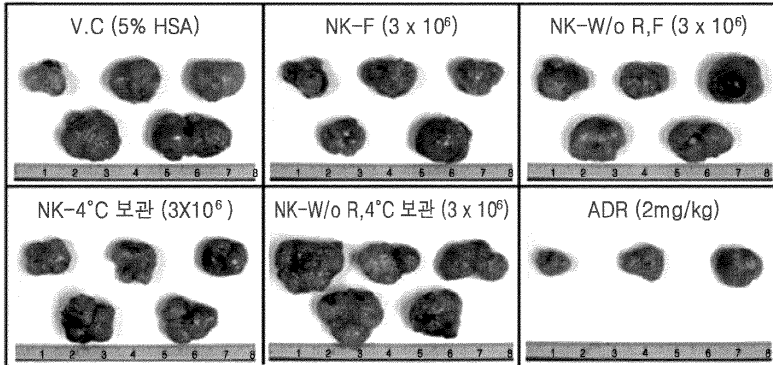


도면5c

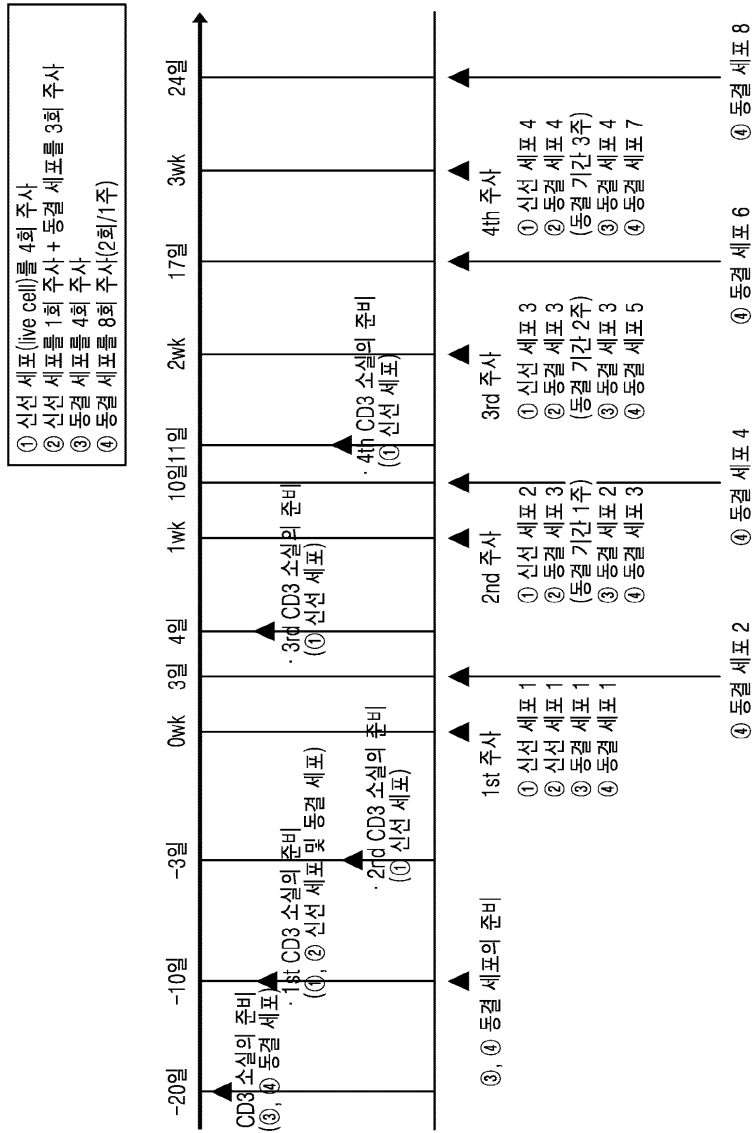
주 1회 X 4주



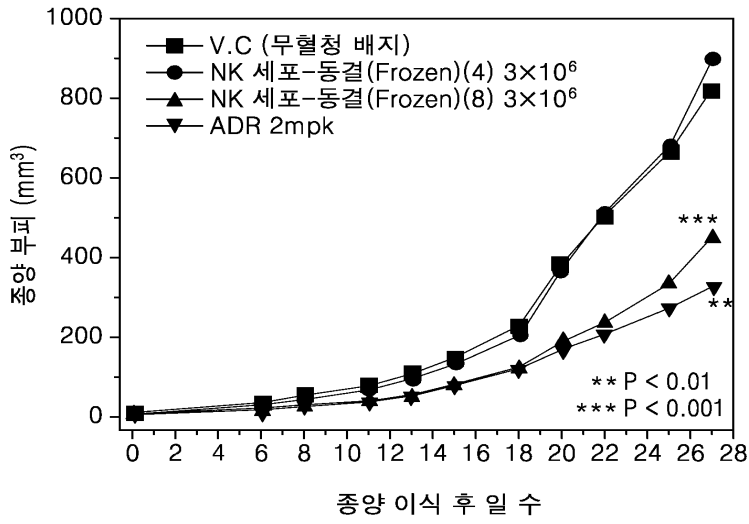
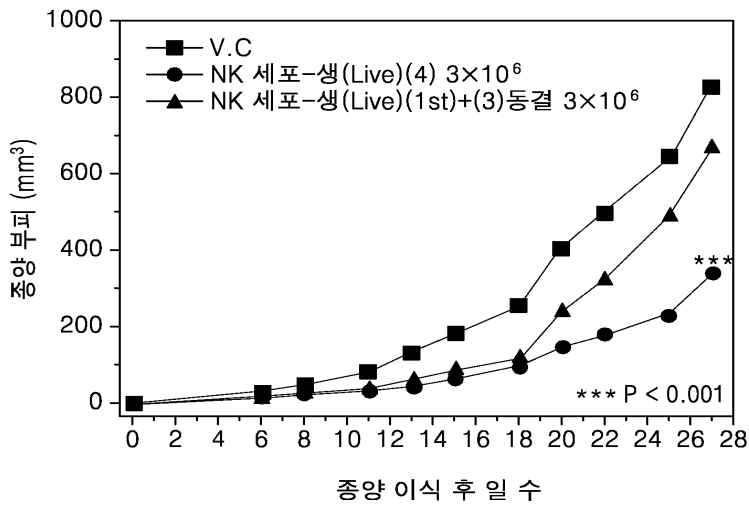
주 2회 X 2주



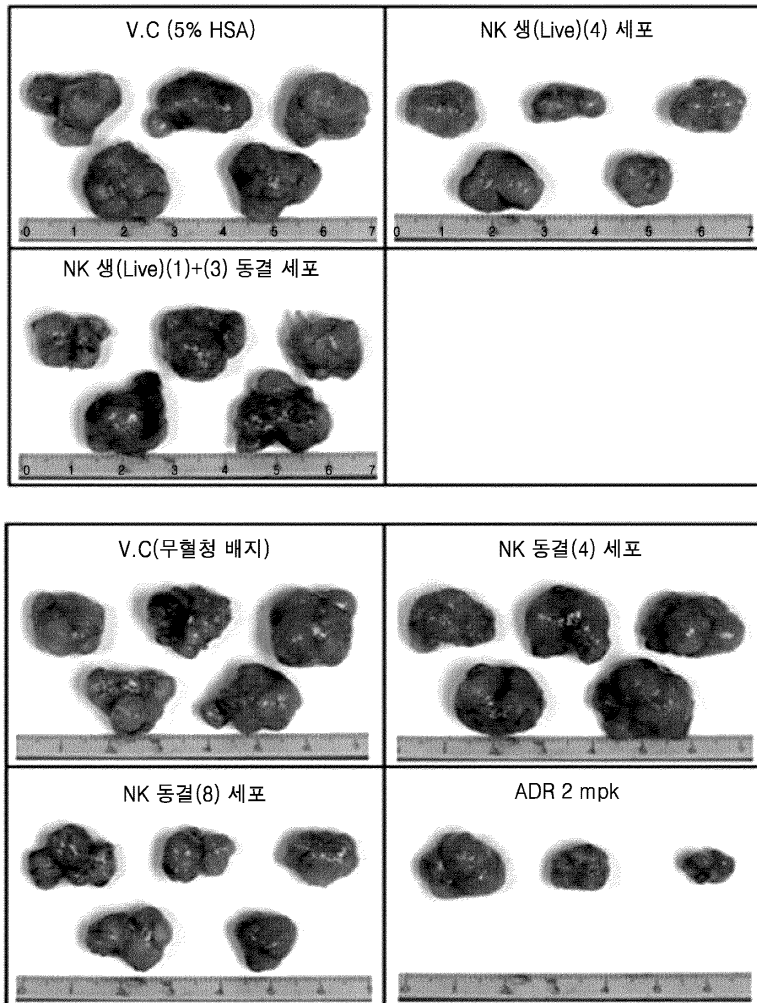
도면6a



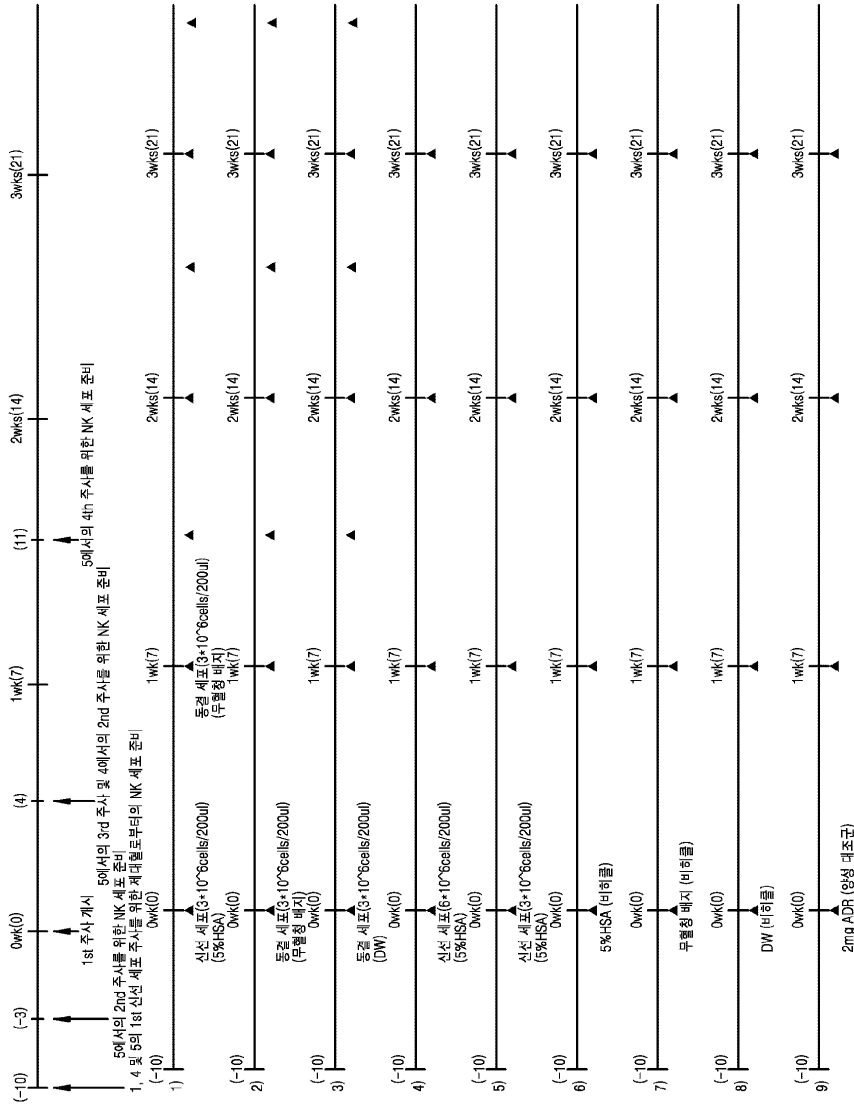
도면6b



도면6c

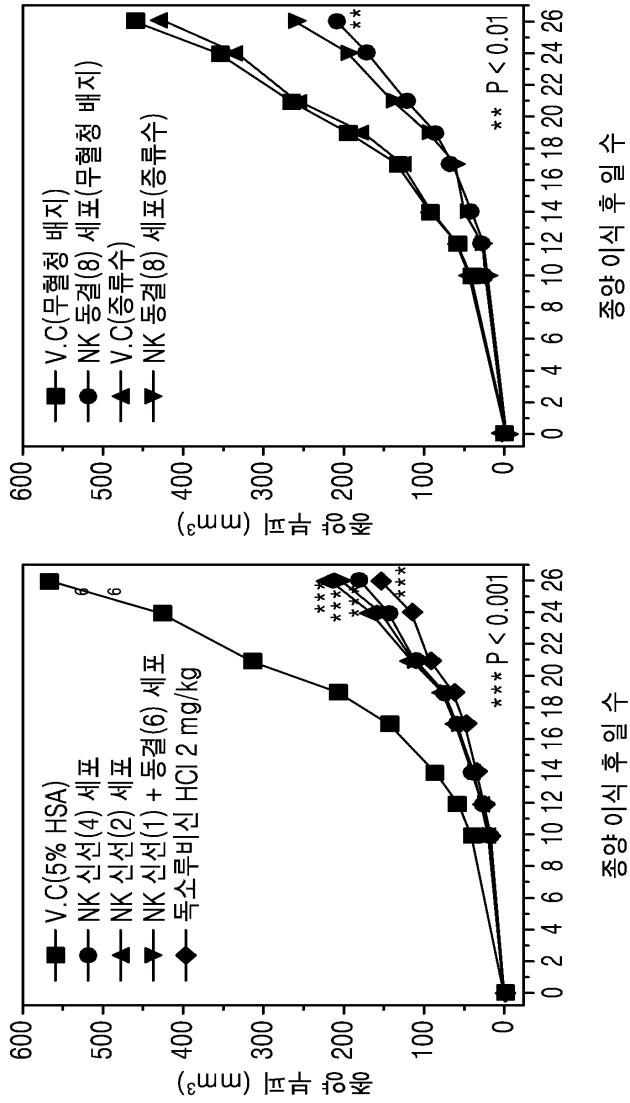


도면7a

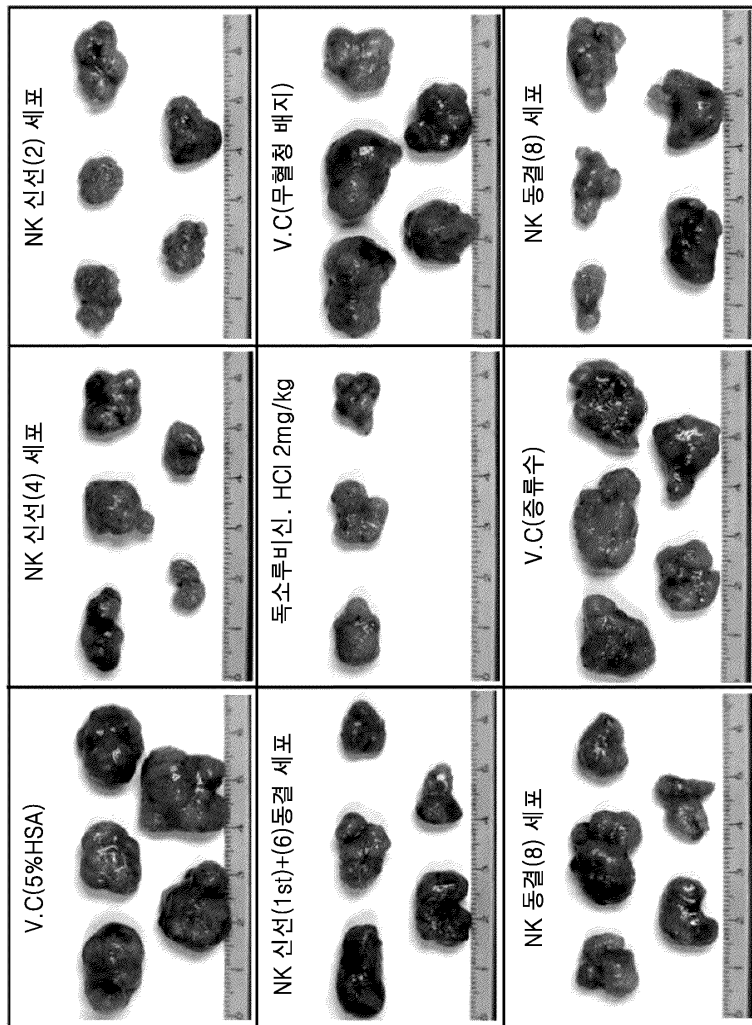


도면7b

중양크기 변화

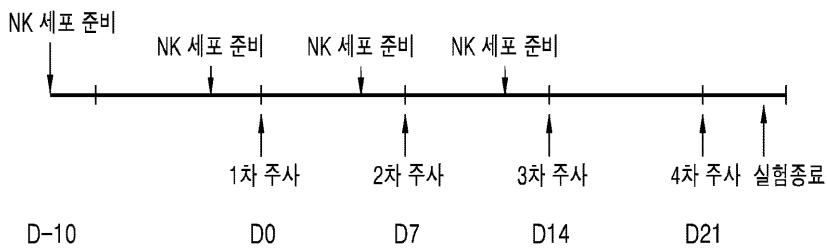


도면7c

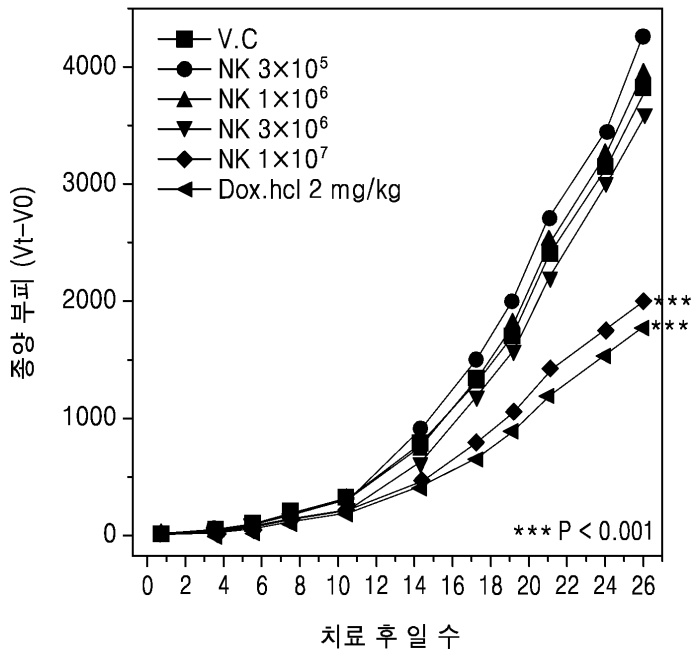


도면8a

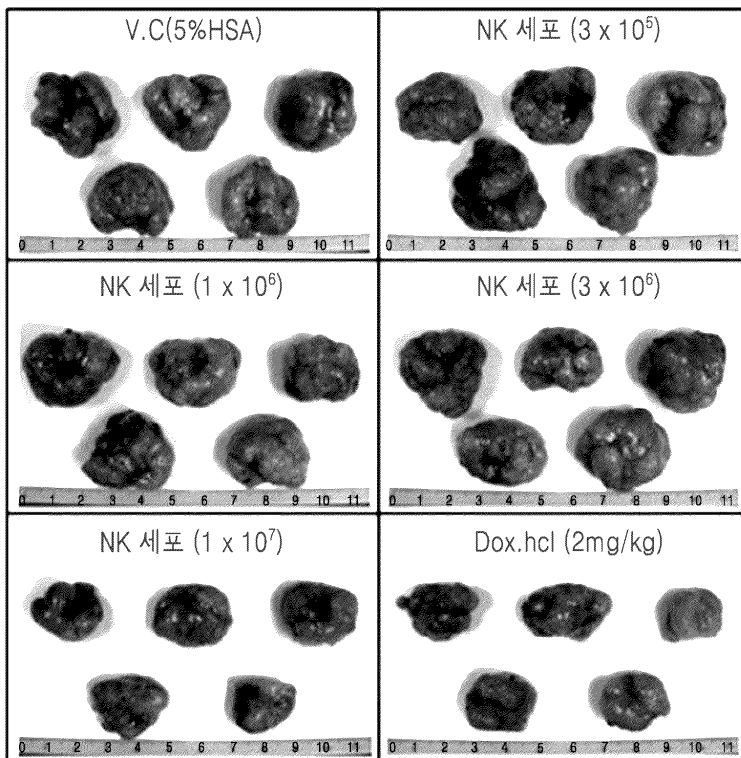
- G1. 용매대조군 (5%HAS)
- G2. NK 세포 (신선, 3×10^5 세포/마우스)
- G3. NK 세포 (신선, 3×10^5 세포/마우스)
- G4. NK 세포 (신선, 3×10^6 세포/마우스)
- G5. NK 세포 (신선, 1×10^7 세포/마우스)
- G6. 독소루비신.HCl(생리식염수 내)(2mg/kg)



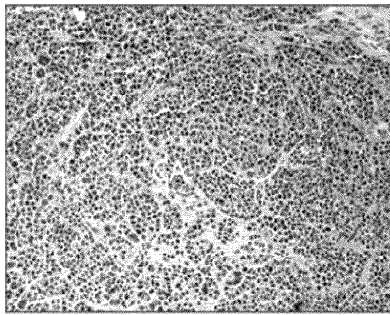
도면8b



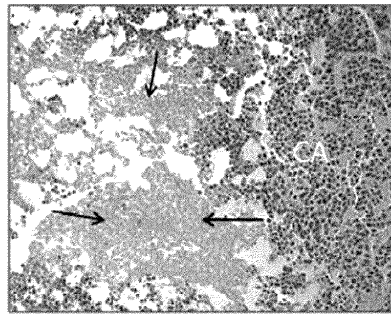
도면8c



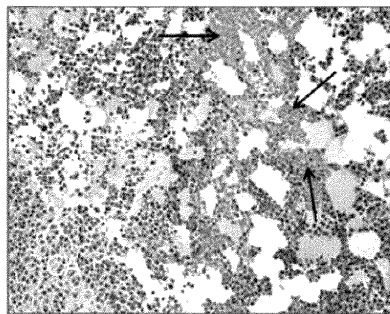
도면8d



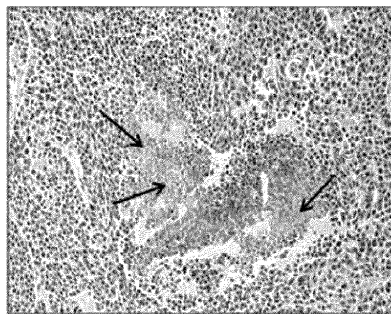
1차 V.O



1차 3×10^5



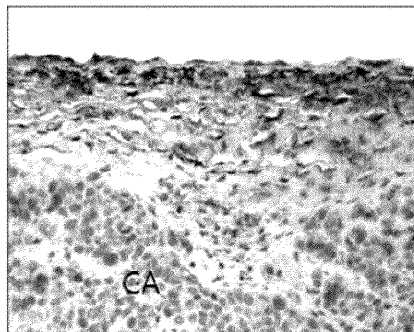
1차 1×10^6



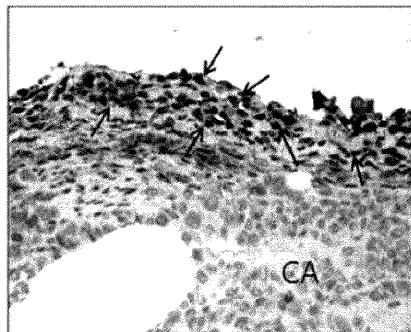
1차 3×10^6

H-E 염색, x200

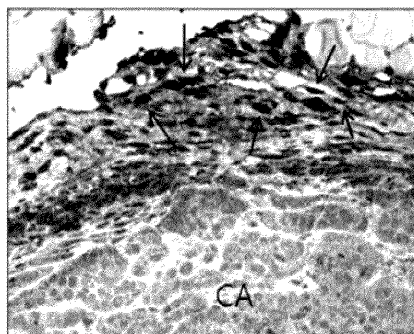
도면8e



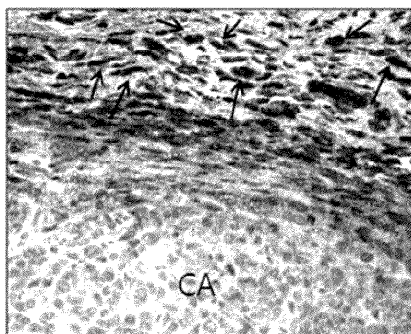
1차 V.O



1차 3×10^5



1차 1×10^6

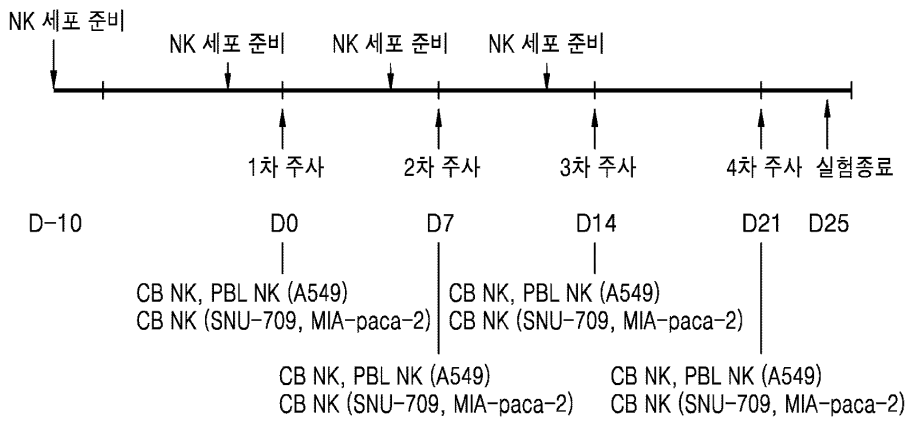


1차 3×10^6

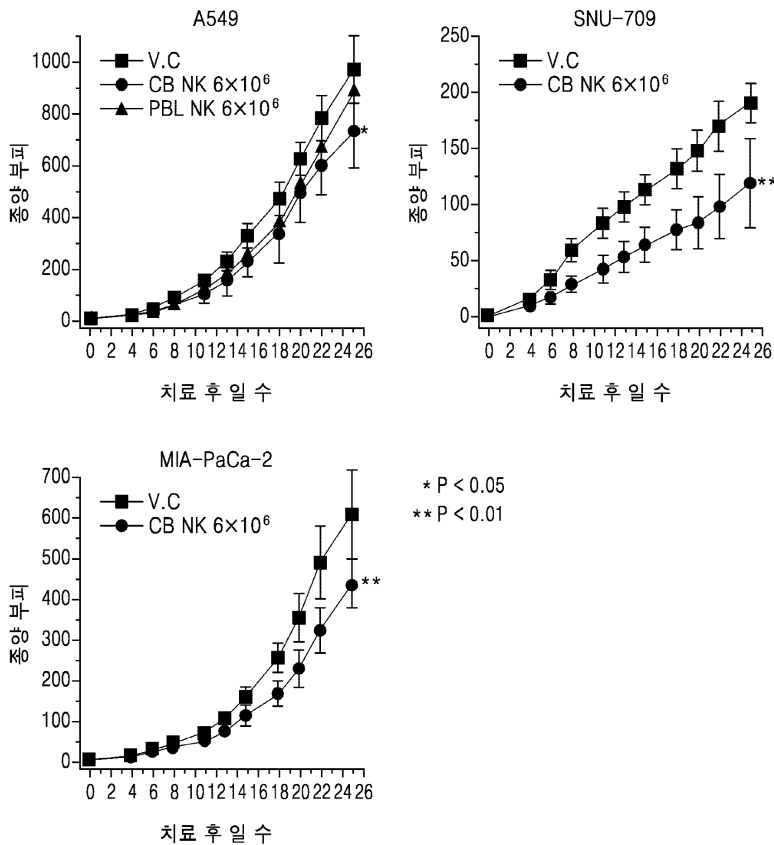
CD56 x400

도면9a

- A549
 - G1. 용매대조군 (5%HAS)
 - G2. CB NK 세포 (신선, 6×10^6 세포/마우스)
 - G3. PBL NK 세포 (신선, 6×10^6 세포/마우스)
- SNU-709
 - G4. 용매대조군 (5%HAS)
 - G5. CB NK 세포 (신선, 6×10^6 세포/마우스)
- MIA-paca-2
 - G6. 용매대조군 (5%HAS)
 - G7. CB NK 세포 (신선, 6×10^6 세포/마우스)

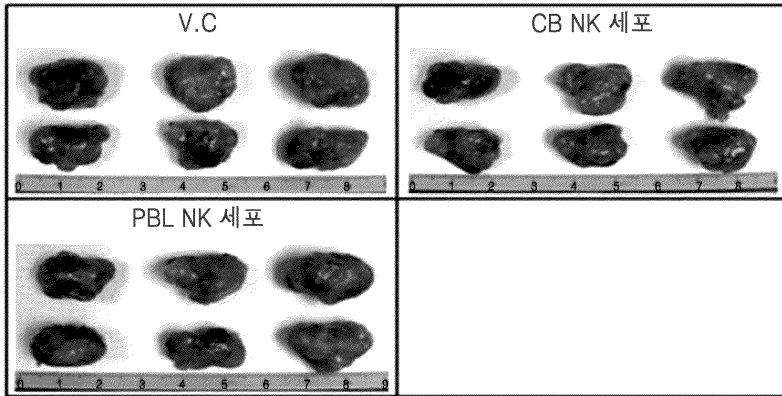


도면9b

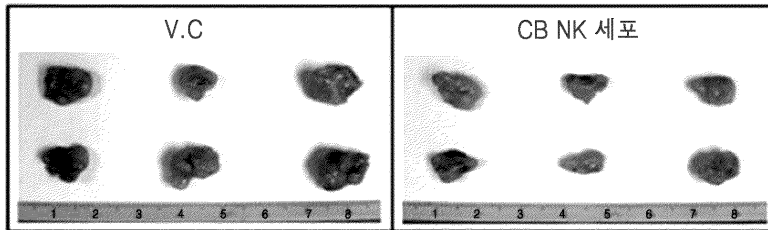


도면9c

A549 종양의 최종일(25일차) 사진



SNU-709 종양의 최종일(25일차) 사진



MIA-PaCa-2 종양의 최종일(25일차) 사진

